N° d'enregistrement au
C.N.R.S. : A.O.6743

THESE
DE
DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Monsieur COSSON Louis

pour obtenir

le grade de Docteur Es Sciences

Sujet de la thèse :

INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT SUR LA TENEUR EN ALCALOIDES TROPANIQUES DES DATURA : ANALYSE DES PROCESSUS POUVANT EN EXPLIQUER LES EFFETS.

Soutenue le 26 Février 1972 devant la commission d'examen

MM.	CHOUARD	Président
	LEDERER	Examinateurs
	PARIS	

Sujet de la thèse :

INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT SUR LA TENEUR EN ALCALOIDES TROPANIQUES DES DATURA ; ANALYSE DES PROCESSUS POUVANT EN EXPLIQUER LES EFFETS.

Soutenue le 25 Février 1972 devant la commission d'examen

MM. CHOUARD Président

LEDERER Examinateurs

PARIS

N° d'enregistrement au
C.N.R.S. : A.O.6743

THESE
DE
DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Monsieur COSSON Louis

pour obtenir

le grade de Docteur Es Sciences

Sujet de la thèse :

INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT SUR LA TENEUR EN ALCALOIDES TROPANIQUES DES DATURA : ANALYSE DES PROCESSUS POUVANT EN EXPLIQUER LES EFFETS.

Soutenue le 26 Février 1972 devant la commission d'examen

MM.	CHOUARD	Président
	LEDERER	Examinateurs
	PARIS	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

L'ensemble de ce travail a été effectué au laboratoire du Phytotron du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette, sous la direction de Monsieur le Professeur CHOUARD et de Monsieur le Professeur PARIS.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur CHOUARD pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé dans son laboratoire et pour les conseils qu'il me prodigua.

Je prie Monsieur le Professeur PARIS de trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour la bienveillance et l'efficacité avec laquelle il m'a toujours guidé.

Je remercie Monsieur le Professeur LEDERER de l'amabilité avec laquelle il accepta de juger ce travail.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543514_0012

J'adresse tous mes remerciements à ceux de mes camarades du laboratoire qui m'ont aidé de leur amitié.

C'est avec plaisir que je remercie le personnel du laboratoire du PHYTOTRON et tout spécialement les membres du service des cultures.

Je ne saurais oublier l'aide amicale et la diligence de Mesdames LOYAU, SANDMEIER et DEFOREIT. Qu'elles soient assurées de ma gratitude.

Je remercie bien vivement Madame HUBAC de ses conseils, Madame GUERRIER et J. FERRAN de leur aide efficace.

C'est avec le sentiment de ne pouvoir jamais m'acquitter d'une dette de reconnaissance que je voudrais dire à Madame DEQUEANT combien j'ai apprécié son dévouement, la précision et la fidélité de son travail. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

I. INTRODUCTION

De nombreux travaux ont été consacrés à l'observation des variations ontogéniques des alcaloïdes ; l'influence des facteurs externes a été étudiée également , mais seulement en conditions naturelles ou dans des serres dont les paramètres climatiques n'étaient pas rigoureusement contrôlés (SOKOLOV , 1959 ; FLUCK , 1961 ; CUCU et PAUN , 1968).

Il est apparu souhaitable d'utiliser l'avantage offert à ce sujet par le Phytotron du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette pour connaître , d'une manière précise , l'influence d'un des facteurs de l'environnement : l'éclairement.

Cette expérimentation a été conduite de façon à montrer les variations ontogéniques de la teneur en alcaloïdes tropaniques en fonction des conditions d'éclairement de deux espèces de Datura : Datura tatula L. et Datura metel Sims (Syn. Datura innoxia Mills).

Les résultats obtenus ont prouvé l'influence certaine de l'éclairement sur l'accumulation de l'hyoscyamine et de la scopolamine dans les feuilles des plantes. Pour tenter de trouver une explication à cet effet, l'étude de certaines voies enzymatiques , cataboliques et anaboliques , a été entreprise de façon à pouvoir mettre en parallèle les variations des teneurs alcaloïdiques avec celles de l'activité de certaines enzymes.

II. HISTORIQUE

Les plantes à alcaloïdes ont été utilisées en médecine populaire ou lors de cérémonies d'initiation bien avant que leurs principes actifs soient connus des chimistes. Cependant leur étude scientifique ne commença qu'après l'isolement de la morphine par SERTURNER en 1804.

Actuellement on connaît la structure d'environ un millier d'entre eux. Ils appartiennent à de nombreux groupes chimiques parmi lesquels nous citerons seulement ceux dérivant du pyrrole , de la pyridine , de la quinoléine , de l'indole , du noyau stéroïdique et du tropane (I).

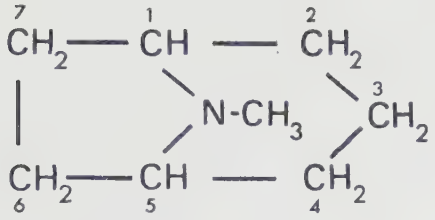
Les alcaloïdes tropaniques sont divisés en deux groupes : ceux rencontrés dans les feuilles des Erythroxylon , la cocaïne en particulier, et ceux extraits de diverses Solanacées appartenant aux genres Atropa, Duboisia , Hyoscyamus , Mandragora , Scopolia et Datura.

Les deux alcaloïdes principaux des Datura sont l'hyoscyamine (II) et la scopolamine (III).

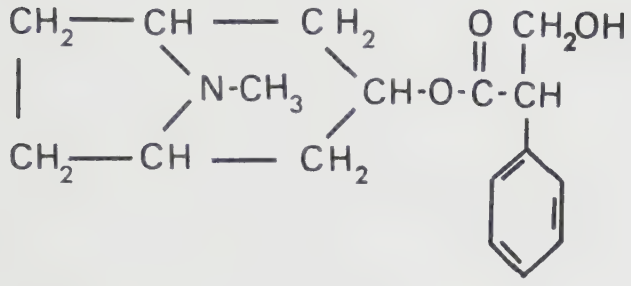
L'hyoscyamine est l'ester d'un amino-alcool , le tropanol (IV) et de l'acide-L-tropique . La scopolamine (ou hyoscine) est l'ester du scopanol (VI) et de l'acide - L- tropique.

Grâce à l'emploi des radioéléments , les principales étapes de leur biosynthèse sont à peu près connues. Le schéma de la Figure 1 indique les différentes voies possibles conduisant des précurseurs aux alcaloïdes.

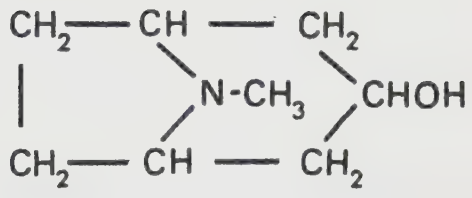
Le précurseur le plus important est l'ornithine : LEETE(1964) a montré que l'ornithine 2-^{14}C fournie à des plantes de Datura stramonium conduisait à la formation d'hyoscyamine marquée sur le carbone 1. Cependant la putrescine ayant deux atomes (C_1 et C_4) de carbone marqués



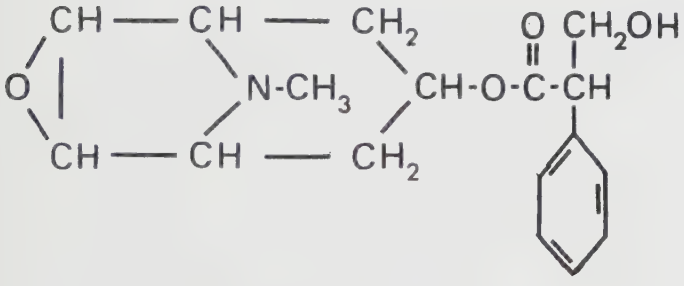
I. Tropane



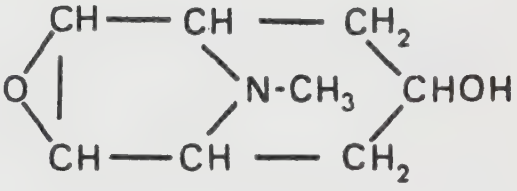
II. Hyoscyamine



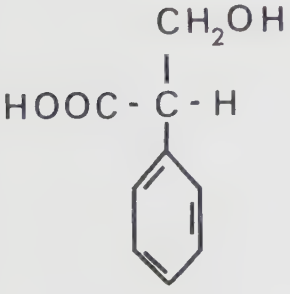
IV. Tropanol



III. Scopolamine



VI. Scopanol



V. Acide tropique

est également un précurseur de l'hyoscyamine (KACZKOWSKI et MARION , 1963 ; LEETE et LOUDEN , 1963; LIEBISCH , SCHUTTE et MOTHES ,1963). Dans ce cas, l'hyoscyamine obtenue possède deux atomes de carbone radioactif (C_1 et C_5) . LIEBISCH et coll. (1966), utilisant des cultures de racines de Datura metel alimentées avec de la N-méthylputrescine (^{14}-CH_3 et ^{15} N) , mirent en évidence l'incorporation de ce composé avec son groupe méthyle , dans l'hyoscyamine et dans la scopolamine.

Il y aurait donc plusieurs voies possibles pour la biosynthèse de ces deux alcaloïdes.

La N-méthylation de l'ornithine suivie d'une décarboxylation pourrait mener à la molécule d'alcaloïde marquée sur un seul carbone.

Au contraire la décarboxylation de l'ornithine produirait la putrescine qui, après méthylation , aboutirait à l'hyoscyamine marquée en C_1 et en C_5.

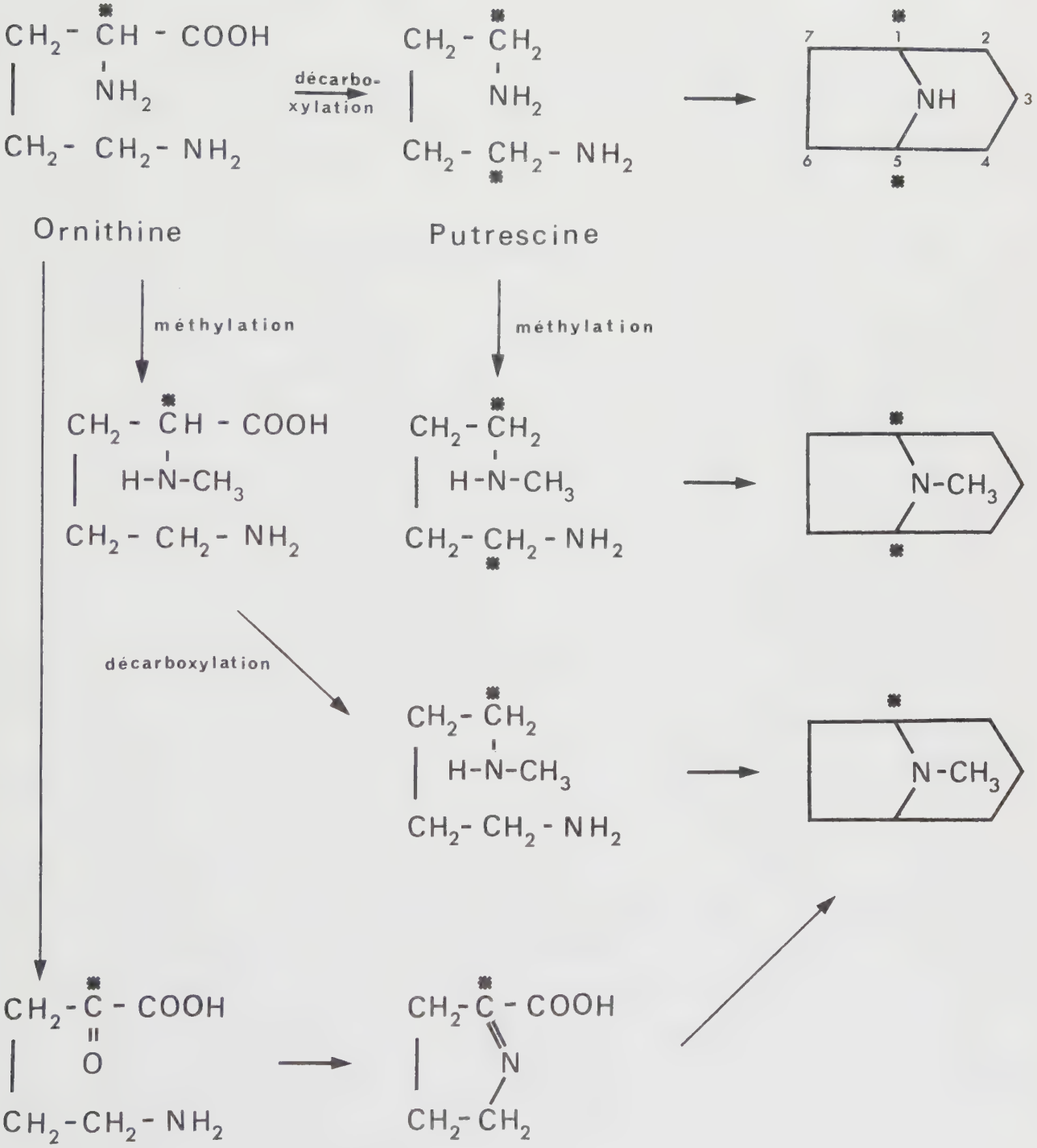
Par ailleurs , il n'est pas exclu que la méthylation intervienne après fermeture du cycle. On ignore encore laquelle de ces voies est la plus importante in vivo (T.ROBINSON, 1968).

Les carbones 3 et 4 de la molécule de ces alcaloïdes dérivent de deux molécules d'acétate par l'intermédiaire de l'acétoacétate (KACZKOWSKI, SCHUTTE et MOTHES, 1960, 1961).

GIBSON et ABBOTT démontrèrent en 1963 l'augmentation de la teneur en hyoscyamine et en scopolamine des racines de Datura tatula cultivées isolément sur des milieux nutritifs contenant de la proline; une forte augmentation de la teneur en scopolamine fut observée pour certaines concentrations en proline.

En 1964, SULLIVAN et GIBSON mirent en évidence l'incorporation de la ^{14}C- proline dans l'hyoscyamine et la scopolamine de Datura tatula et Datura innoxia . GIBSON et DANQUIST , en 1965, ont observé l'incorporation de l'hydroxyproline 2 -^{14}C dans les alcaloïdes des racines de Datura innoxia.

Figure 1 : Les différentes voies possibles de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques.
(D'après T. ROBINSON , 1968)



Tous ces auteurs ont suggéré que cette incorporation de proline se ferait par une voie indirecte : la proline serait d'abord incorporée dans les protéines. Postérieurement à la dégradation de ces dernières, la proline libérée serait utilisée dans la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques.

Les tissus végétaux contenant peu d'ornithine , mais davantage d'arginine , JINDRA et coll. (1959, 1968) ont insisté sur l'importance que pourrait avoir l'activité de l'arginase grâce à son contrôle de la teneur en ornithine.

VERZAR-PETRI (1966a) a montré que, chez certaines espèces de Datura, le maximum de la teneur en alcaloïdes correspondait à une diminution des quantités d'ornithine , de proline et d'arginine.

Après injection de glycine 2-^{14}C à des Datura ferox , EVANS et PARTRIDGE (1954) ont observé qu'elle ne se répartissait pas uniformément dans les différentes parties de la plante, la plus grande quantité restant près du site de l'injection. Ces auteurs ont cependant mis en évidence la formation de scopolamine marquée.

En utilisant le Datura tatula, LEETE et LOUDEN (1961) ont mis en évidence le rôle de la phénylalanine comme précurseur de l'acide tropique ; le C_2 de la chaîne latérale de cet acide aminé devenant le C_3 de l'acide tropique et le C_3 du précurseur devenant le C_2 de l'acide. Avec la même espèce , GOODEVE et RAMSTAD (1961) prouvèrent que le C_3 du tryptophane devenait le C_3 de l'acide tropique.

La transformation de l'hyoscyamine en scopolamine dans les organes aériens des Datura a été particulièrement étudiée par ROMEIKE (1956, 1959, 1960, 1963). Les intermédiaires possibles entre ces deux alcaloïdes seraient la 6, 7-déhydro-hyoscyamine et la 6-hydroxy-hyoscyamine (MOTHES, 1963). L'époxydation ne s'effectuerait que sur la molécule complète, le tropanol libre ne pouvant pas être transformé en scopanol. Le lieu de cette transformation varierait selon les différentes espèces (ROMEIKE, 1961).

L'obtention de l'époxydation in vitro n'est mentionnée qu'une seule fois dans la littérature (BABCOK et PLOTKIN, 1967). Ces auteurs auraient obtenu la transformation réciproque de l'hyoscyamine en scopolamine à partir d'homogénats issus de cultures isolées de racines de Datura innoxia.

L'amino-alcool et l'acide tropique, élaborés séparément dans la plante, forment ensuite l'ester par voie enzymatique.

Cette réaction fut d'abord mise en évidence in vivo par ROMEIKE (1959) dans les racines de Datura ferox et chez le Datura stramonium par KACZKOWSKI (1959); ANDRZEJCZUK et KACZKOWSKI (1962) obtinrent le même résultat avec des cultures de racines de Datura metel.

Cette réaction fut confirmée par les travaux effectués in vitro par JINDRA et coll. (1960). Ils hydrolysèrent l'hyoscyamine et l'atropine à partir d'un extrait aqueux lyophilisé de racines de Datura stramonium et obtinrent la synthèse de l'alcaloïde-ester à partir de ses deux constituants , tropanol et acide tropique. KACZKOWSKI en 1965 apporta des précisions sur ces deux réactions in vitro : l'enzyme responsable de l'hydrolyse est sept fois plus active que celle conduisant à la synthèse. En 1968 JINDRA et STABA montrèrent que des préparations enzymatiques obtenues à partir de cultures de tissus de Datura stramonium possèdent l'enzyme responsable de l'esterification du tropanol par l'acide tropique.

KOUASSI et PEAUD-LENOEL (1970) obtinrent la formation d'hyoscyamine dans des cals issus de tiges et de racines de Datura metel en ajoutant du tropanol au milieu gélosé sur lequel se développent les cals.

Les premières étapes de la biosynthèse du noyau tropanique menant de l'ornithine à l'acide α - céto- δ aminovalérique ont été envisagées par JINDRA et coll. (1960).

De nombreux auteurs ont montré que la teneur en alcaloïdes des Datura varie durant les différentes phases de développement des plantes

(GUILLON, 1950; EVANS et PARTRIDGE, 1953;MOTHES, 1960; EVANS et STEVENSON, 1962; GERTIG et CZYZAK, 1962; VERZAR-PETRI, 1965, 1966 b et c , 1967).

Les travaux ayant trait à l'influence des facteurs climatiques sur les teneurs en alcaloïdes ont abouti fréquemment à des résultats contradictoires, la plupart ayant été menés en conditions naturelles (FLUCK, 1955; SOKOLOV, 1959).

L'influence directe de la lumière sur la biogenèse de la scopolamine ne semble pas devoir être retenue : ROMEIKE (1963) a montré que cet alcaloïde se formait aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière. Celle-ci pourrait cependant agir d'une manière indirecte (FLUCK , 1961).

C'est pour tenter d'élucider le problème posé par l'influence des facteurs externes sur la biogenèse des alcaloïdes des Datura que nous avons entrepris ce travail au Phytotron.

Celui-ci permet particulièrement ce genre d'expérimentation qui nécessite un contrôle rigoureux des différents paramètres climatiques agissant sur le développement des plantes et sur leur teneur en alcaloïdes.

Nous avons principalement étudié les effets de l'éclairement sur la teneur en alcaloïdes et tenté de fournir une explication biochimique aux variations observées.

III. MATERIEL ET METHODES

A. Matériel et conditions de culture.

Deux espèces de Datura ont servi à l'expérimentation : Datura tatula L. et Datura metel Sims. (= Datura innoxia Mills).

Datura tatula appartient au groupe ne possédant la faculté d'époxydation de l'hyoscyamine que dans les stades de jeunesse de la plante (EVANS et PARTRIDGE , 1953).

Datura metel, au contraire, contient toujours de la scopolamine en quantité prédominante (VERZAR-PETRI, 1965).

Les graines ont été initialement fournies par le Museum National d'Histoire Naturelle de Paris : leur renouvellement étant assuré , tous les trois ans , par la récolte de graines sur des plantes cultivées dans le champ expérimental du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette (91). Ces plantes sont issues de semis effectués en serre et de repiquages sous châssis. Cette méthode permet une récolte abondante de graines sur des plantes vigoureuses , durant les mois d'Août et de Septembre.

La culture des plantes d'expérience est pratiquée dans les salles à éclairage artificiel du Phytotron, suivant les conditions décrites précédemment (COSSON, CHOUARD et PARIS, 1966; COSSON, 1969).

Dans la salle choisie, la température est constamment de 27°C et l'humidité relative de 65 ou 70%. Des plafonds lumineux , constitués de tubes fluorescents et de lampes à incandescence , fournissent au niveau des plantes un éclairement de 14 000 à 18 000 lux.

Les semis sont effectués dans de la vermiculite , les plantes rempotées dans de la laine de verre (verrane) recouverte de vermiculite. Elles sont arrosées deux fois par jour : le matin avec une solution nutritive (CHOUARD et TRAN THANH VAN , 1964) , le soir avec de l'eau désionisée.

Pour étudier l'influence de la durée et de l'intensité de l'éclairement , cinq conditionnements lumineux sont choisis :

- éclairement continu de niveau élevé : " 24 h " ;
- éclairement de niveau élevé : " 16 h " ;
- éclairement de niveau élevé : " 9 h " ;
- 9 h d'éclairement de haut niveau après lesquelles la nuit est interrompue par une demi heure d'un éclairement rouge : " 9 h + R " ;
- 9 h d'éclairement de niveau élevé suivies de 7 h de très faible niveau : " 9 h + 7 h " .

Cinq stades sont distingués dans l'ontogénèse de la plante.

Le premier stade est celui des très jeunes plantules montrant les cotylédons déployés horizontalement. Au stade 2, la plante comporte 3 ou 4 jeunes feuilles chez Datura tatula, 7 à 9 feuilles chez Datura metel. Le stade 3 est marqué par l'apparition du premier bouton floral. Le stade 4 est caractérisé par l'épanouissement de la première fleur. Le stade 5 correspond au début de maturation des premiers fruits.

B. Techniques analytiques

1) Obtention des extraits alcooliques

L'étude systématique des teneurs en hyoscyamine et en scopolamine des organes aériens est menée selon la méthode d'extraction et de dosage décrite précédemment (PARIS et COSSON, 1965).

L'extraction est obtenue par l'alcool à 96° à l'ébullition , dans lequel les organes sont plongés immédiatement après leur prélèvement. Les liqueurs extractives sont évaporées sous vide, reprises par l'acide sulfurique à 1% et filtrées.

Après alcalinisation par l'ammoniaque , les alcaloïdes sont extraits par agitation avec du chloroforme. Celui-ci est évaporé . Le résidu sec est repris par une quantité connue avec précision d'alcool à 96°. La solution alcoolique est alors déposée sous forme d'une gamme de spots, à l'aide de micropipettes , sur du papier Whatman n°1. Des témoins d'hyoscyamine et de scopolamine-bases sont également déposés: chaque témoin correspond à 2 microgrammes de chacune de ces bases.

Le chromatogramme est développé dans le solvant, n-butanol-acide acétique-eau (4-1-5 v/v). La révélation se fait par pulvérisation du réactif de Dragendorff (formule de MUNIER et MACHEBOEUF). Lorsque l'excès de révélateur a disparu , l'intensité des taches de la gamme de l'extrait est comparée avec celle des taches correspondant aux témoins (procédé visuel).

Les extraits sont repris par une quantité d'alcool telle que l'égalité des intensités se situe entre 30 et 60 microlitres, les volumes déposés allant en croissant de 5 en 5 microlitres.

La recherche qualitative des traces de tropanol et de scopanol libres dans les extraits , ainsi que l'évaluation approximative des teneurs en hyoscyamine et en scopolamine des racines sont effectuées, après purification , par chromatographie sur couche mince de cellulose[1] avec le solvant isobutanol-acide-chlorhydrique-eau (7-1-2 v/v). Les chromatogrammes sont révélés par le réactif de Trabert qui est une solution d'iodobismuthite de potassium dans un mélange de méthanol et d'éther (SAINT-FIRMIN et PARIS , 1967 ; COSSON, 1968).

---

[1] Couches minces prêtes à l'emploi, marque Selecta de Schleicher et Schull.

Le poids de substance sèche est déterminé par dessiccation des organes à l'étuve à 100-110°C pendant 24 heures.

2) Techniques concernant les activités enzymatiques.

a) Hydrolyse in vitro

Préparation des extraits enzymatiques.

L'étude, in vitro, des réactions enzymatiques est menée à l'aide d'extraits enzymatiques bruts. Immédiatement après leur prélèvement, les organes végétaux sont broyés dans un homogénéiseur de Potter avec un volume de solution tampon équivalent à la moitié de leur poids: la solution utilisée étant à 0, 2 M de phosphates et son pH égal à 6, 5. Le travail est fait en chambre froide et l'homogénéiseur maintenu dans de la glace pendant la durée du broyage.

La suspension obtenue est ensuite centrifugée pendant 30 à 35 minutes à 120 000 x g. Le volume du surnageant est mesuré : chaque réaction utilise un volume correspondant à 400 mg de matière fraîche .

Etude de la réaction.

Le pouvoir hydrolytique des extraits enzymatiques est étudié sur les bromhydrates d'hyoscyamine et de scopolamine; ceux-ci sont en solution, à la concentration de 0,1 M, dans un tampon-phosphate 0, 2 M de pH = 5, 6 : 0,15 ml de chacune de ces deux solutions est utilisé avec le volume requis d'extrait.

Chaque série expérimentale comporte quatre tubes :

Tube I: extrait enzymatique + 0,15 ml tampon-phosphate de pH = 5, 6 (Tube témoin)

Tube II: extrait enzymatique + 0,15 ml solution bromhydrate d'hyoscyamine

Tube III: extrait enzymatique + 0,15 ml solution bromhydrate de scopolamine

Tube IV: extrait enzymatique + 0,15 ml solution bromhydrate d'hyoscyamine + 0,15 ml solution bromhydrate de scopolamine.

Le pH des tubes réactionnels est compris entre 5, 6 et 5, 8.

Les tubes sont maintenus dans une enceinte à 27°C pendant 48 heures, durée à la fin de laquelle la réaction est arrêtée par adjonction d'acide sulfurique à 1%.

Le contenu de chaque tube est ensuite purifié par la méthode déjà citée , utilisant l'extraction des alcaloïdes ou des bases similaires par le chloroforme , après alcanilisation par l'ammoniaque.

Après évaporation du chloroforme , le résidu est repris par 0, 3 ml d'alcool à 96° ; 15 microlitres sont alors déposés sur une couche mince de cellulose qui est développée dans le solvant isobutanol-acide chlorhydrique-eau , déjà mentionné .Après séchage, le révélateur de Trabert est pulvérisé : le tropanol et le scopanol obtenus par l'hydrolyse de l'alcaloïde-ester apparaissent en violet ou en mauve sur le fond jaune du chromatogramme.

L'intensité de la coloration est comparée à celle des témoins constitués par 2 microgrammes de tropanol pur(1) et de scopoline(1) (ou 3, 6 - époxy-7-hydroxy-tropane), isomère du scopanol.

Cette observation permet une première évaluation de l'importance de la réaction.

Lorsque l'intensité de la coloration des taches de tropanol et de scopanol issus de la réaction enzymatique est égale ou plus faible que celle correspondant aux témoins , l'extrait initial est alors évaporé à sec et repris par 0,1 ml d'alcool à 96° ; 15-20 et 25 microlitres de cette solution sont déposés sur une couche mince de silice(2) en alternance avec 1, 2 et 5 microgrammes de témoin.

---

(1) Témoins fournis par les Etablissements SERLABO

(2) Couches minces prêtes à l'emploi , marque Selecta de Schleicher et Schull.

Le chromatogramme est développé dans le solvant acétone-chloroforme-ammoniaque à 25% (160 ml, 10 ml, 25 ml), séché pendant 1 heure dans un courant d'air et révélé par immersion pendant 10 secondes environ dans le réactif de Dragendorff, formule de François et Seguin (ROUSSELET, 1963).

Cette technique permet d'obtenir des taches particulièrement nettes sur un fond d'une coloration jaune parfaitement uniforme après séchage. Le tropanol apparaît en rouge, le scopanol et la scopoline en mauve, les alcaloïdes ayant la couleur orangée habituelle.

Cette deuxième analyse permet de vérifier la première chromatographie et de savoir si les quantités de tropanol et de scopanol formées sont inférieures ou sensiblement égales à 40 microgrammes, ce qui correspond à 14/100 de micromoles de tropanol et à 13/100 de micromoles de scopanol.

Lorsque l'analyse chromatographique initiale, sur couche mince de cellulose, a révélé des taches de tropanol et de scopanol plus importantes que celles des témoins, l'extrait initial est alors analysé quantitativement par densitométrie directe à l'aide d'un "Chromoscan Joyce et Loebl" muni d'un filtre vert destiné à augmenter le contraste entre les taches et le fond du chromatogramme.

Une chromatographie sur couche mince de silice est effectuée pour ce dosage. Elle comporte une gamme de quatre spots de l'extrait (en solution dans un volume connu d'alcool à 96°), en alternance avec quatre spots de témoin: en général, 2, 4, 6 et 8 microgrammes de tropanol ou 6, 8, 10 et 12 microgrammes de scopoline). Dans le cas du dosage du tropanol le développement se fait par le solvant déjà cité, 160 ml d'acétone, 10 ml de chloroforme et 25 ml d'ammoniaque à 25%, son Rf est alors de 0, 07.

Pour le dosage du scopanol une modification est apportée au solvant : il ne contient que 10 ml d'ammoniaque à 25%. Ceci permet une migration moins importante du scopanol : Rf = 0, 20

au lieu de 0, 45 dans l'autre solvant. Il en est de même pour le témoin de scopoline : Rf = 0, 42 au lieu de 0, 60.

Les taches sont alors plus rondes et beaucoup moins diffuses. Ce solvant ainsi modifié ne peut être utilisé pour le dosage du tropanol , car il n'en permet aucune migration.

Les quantités énoncées pour les témoins permettent d'obtenir une relation linéaire directe entre elles et le nombre d'unités d'intégration indiqué par l'appareil. C'est la moyenne des valeurs obtenues pour chacun des quatre spots de l'extrait qui est prise comme résultat définitif. Celui-ci est ensuite exprimé en micromoles.

b) Réaction enzymatique catalysée par l'A. T. P. (acide adénosine triphosphate).

Une autre réaction enzymatique a été étudiée in vitro en utilisant le même extrait enzymatique auquel est ajouté 0, 10 ml d'une solution d'A. T. P. à 100 mg pour 1 ml de tampon phosphate 0, 2 M de pH =8 . Le pH du milieu réactionnel est alors de 4, 6 à 4, 8.

Le tube témoin contient l'extrait enzymatique et 0, 10 ml de solution tampon pH = 5, 6.

Les tubes sont maintenus à 27°C. La vitesse de la réaction est suivie par prélèvement et chromatographie de 6 à 8 microlitres de chaque tube après un temps d'incubation de 15, 30 et 50 minutes.

Les volumes prélevés sont immédiatement déposés sur couche mince de silice et le chromatogramme développé dans le solvant : acétone 160 ml , chloroforme 10 ml, ammoniaque à 25% 10 ml. La révélation est faite par le réactif de Dragendorff , formule de Seguin et François. Le corps formé pendant la réaction apparaît alors de couleur rouge foncé; son Rf est de 0, 19. La réaction est arrêtée , après une durée de 60 minutes, par adjonction d'alcool. L'ensemble est évaporé en s'aidant du vide ; le résidu est repris par

0, 3 ml d'alcool à 50° et 15 microlitres sont chromatographiés comme il est indiqué ci-dessus.

Pour chaque cas étudié, trois séries de réactions ont été effectuées.

IV. RESULTATS EXPERIMENTAUX

PREMIERE PARTIE. TENEUR EN ALCALOIDES DE DATURA TATULA L. ET DE DATURA METEL Sims CULTIVES SOUS DIVERSES CONDITIONS D'ECLAIREMENT.

A- Teneur en hyoscyamine et en scopolamine des organes aériens de Datura tatula L. (COSSON, CHOUARD et PARIS, 1966).

Les résultats concernant la totalité des organes aériens sont exposés dans le tableau 1 et représentés graphiquement sur les figures 2 et 3.

Ils montrent que, sous les trois conditions d'éclairement employées, l'hyoscyamine est présente seulement à l'état de traces , de l'ordre de 0, 5 mg/100gd'organes frais , aux trois premiers stades du développement. Cet alcaloïde ne devient dosable que lors de l'épanouissement de la première fleur, au stade 4 ; il n'y a pas d e différences significatives entre les trois modes d'éclairement , sa teneur s'élevant de la même façon dans chaque cas.

La teneur en scopolamine est à peu près la même aux trois premiers stades quel que soit l'éclairement. Par contre, elle s'élève brusquement , au stade 4 , en 16 h d'éclairement quotidien de haut niveau , $9 \pm 1,20$ mg/100 g de plante fraîche , alors qu'en 9 h ou en 9 h + 7 h , elle demeure à 2mg/100 g.

Ces résultats concernent la totalité des organes aériens.
Le tableau 2 distingue d'une part les teneurs des organes aériens jeunes (essentiellement les jeunes feuilles terminales au maxium de leur croissance) et d'autre part celles des parties adultes de la plante, tiges et feuilles ayant terminé leur développement.

TABLEAU 1: Alcaloïdes des parties aériennes de Datura tatula, aux différents stades de l'ontogenèse pour 3 conditions d'éclairement. Chaque moyenne est accompagnée de son intervalle de confiance pour le coefficient de sécurité de 95%.

Conditions lumineuses		Stade 1			Stade 2[c]			Stade 3			Stade 4[c]			Stade 5		
		Scop.[a]	Hyos.[b]	Somme	Scop.	Hyos.	Somme	Scop.	Hyos.	Somme	Scop.	Hyos.	Somme	Scop.	Hyos.	Somme
16h	P.F.[d]	4, 5±0, 50	0, 5	5±0, 50	4	0, 5	4, 5	3±0, 45	0, 5	3, 5±0, 45	9±1, 20	2, 5±0, 40	11, 5±1, 60	5±1, 1	4, 5±0, 60	9, 5±1, 70
	P.S.[e]	85±10	9	94±10	43	5	48	33±5	6	39± 5	85±12	24 ± 4	109±16	39±8	35 ±5	74±13
9h	P.F.	3, 5±0, 50	0, 5	4±0, 50	2	0, 5	2, 5	2±0, 40	0, 5	2, 5±0, 40	2±0, 70	2±0, 70	4±1, 40	4±1, 70	3±0, 4	7±2, 10
	P.S.	74±10	11	85±10	25	6	31	26± 5	6	32±5	29±10	29±10	58±20	39±16	29±4	68±20
9h + 7h																
	P.F.	3±0, 50	0, 5	3, 5±0, 50	1, 5	0, 5	2	3±0, 60	0, 5	3, 5±0, 60	2	2	4	3±0, 50	5±1, 50	8±2
	P.S.	68±10	11	79 ±10	20	7	27	42±8	7	49 ±8	30	30	60	28±5	46±14	74±19

[a] Scop. = scopolamine

[b] Hyos. = Hyoscyamine

[c] Aucune différence n'existait entre les différents dosages pour les plantes au stade 2, et pour celles du stade 4 en 9h + 7h

[d] P.F. = en mg/100 g d'organes aériens frais

[e] P.S. = en mg/100 g d'organes aériens secs.

Le phénomène d'accumulation plus important au stade 4 se produit aux deux niveaux , mais les valeurs sont plus élevées dans les organes en croissance.

TABLEAU 2: Teneur en alcaloïdes de Datura tatula au stade 4, en mg/100 g d'organes jeunes et d'organes adultes secs, pour les trois conditions d'éclairement (Valeurs moyennes et intervalles de confiance pour le coefficient de sécurité de 95%).

Organes	16 h			9 h			9 h + 7 h		
	Scop.[a]	Hyos.[b]	Somme	Scop.	Hyos.	Somme	Scop.	Hyos.	Somme
jeunes	114±16	28±6	142±22	47±9	36±11	83±20	56	45	101
adultes	62±9	34±5	96±14	20±10	20±10	40±20	10	18	28

[a] Scop. = Scopolamine.

[b] Hyos. = Hyoscyamine.

Quelques dosages pratiqués sur des organes jeunes prélevés sur des plantes âgées de 3 à 5 mois, présentant de nombreuses fleurs et plusieurs fruits à divers stades de leur maturation, ont donné les résultats suivants, exprimés en mg/100 g de matériel frais (COSSON, 1970).

En 16 h: scopolamine : 12 mg
hyoscyamine : 17 mg
En 9 h: scopolamine : 7 mg
hyoscyamine : 9 mg

Alors qu'au stade 5, les teneurs en hyoscyamine et en scopolamine sont de valeurs voisines, chez les plantes âgées l'hyoscyamine est devenue l'alcaloïde prédominant des feuilles aussi bien en 16 h d'éclaire -

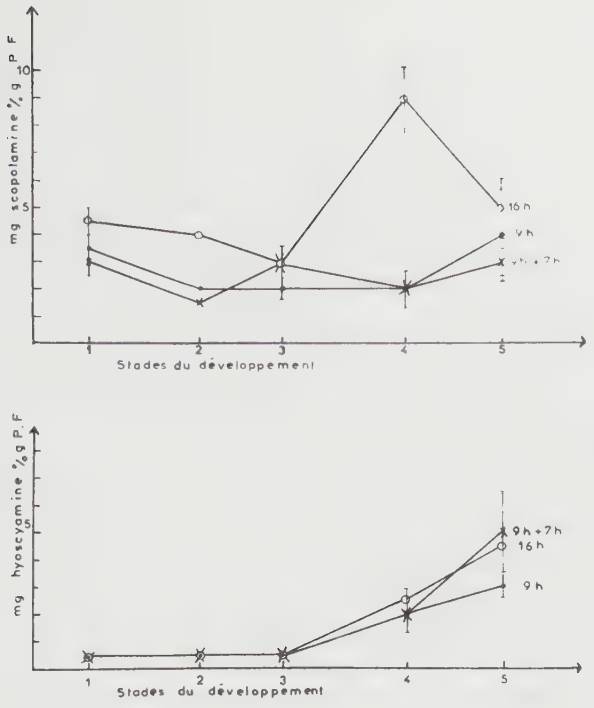


Fig.2. Variations ontogéniques de la scopolamine et de l'hyoscyamine selon l'éclairement chez Datura tatula (Teneur exprimée en mg pour 100 g de plante fraîche).

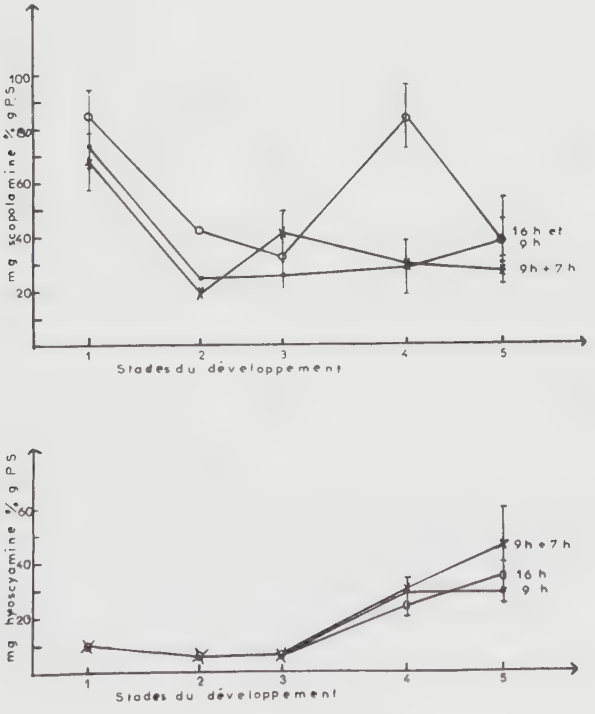


Fig.3. Variations ontogéniques de la scopolamine et de l'hyoscyamine selon l'éclairement chez Datura tatula (Teneur exprimée en mg pour 100 g de plante sèche).

ment quotidien de haut niveau qu'en 9 h. Dans cette dernière condition, les jeunes feuilles accumulent des quantités moindres qu'en 16 h, les rapports étant cependant de même ordre.

B- Teneur en hyoscyamine et en scopolamine des jeunes feuilles de Datura metel Sims (COSSON, 1969).

Cette espèce présente une particularité dans son développement en 16 h d'éclairement quotidien de niveau élevé et en éclairement continu : le premier bouton floral apparu (stade 3a) se dessèche alors qu'il n'est long que de 1 cm, la ramification se développe, un autre bouton se forme et se dessèche à son tour, la nouvelle ramification se produit et le phénomène se poursuit ainsi donnant des plantes qui ont jusqu'à douze niveaux de ramification; un seul niveau entre le sixième et le neuvième présente une fleur épanouie, et pour certaines plantes seulement;tous les autres étant stériles. Cette prolongation de ce "stade 3" a été appelée "stade 3b".

Ce phénomène n'a pas lieu si, dès l'apparition du premier bouton floral, les plantes sont mises pendant 7 à 9 jours, en 9 h d'éclairement et retournent ensuite à leur condition d'origine (16 h ou 24 h). Dans ce cas, le premier bouton floral poursuit son développement et la plante montre une fleur qui s'épanouit et conduit au fruit.

Les résultats des dosages de l'hyoscyamine et de la scopolamine dans les jeunes feuilles en cours de croissance sont présentés dans le tableau 3 et les figures 4 et 5.

En premier lieu, ils mettent en évidence l'absence d'influence de l'interruption de la nuit par un éclairement rouge: dans nos conditions expérimentales, elle est sans effet sur l'accumulation des alcaloïdes.

En ce qui concerne la scopolamine , il y a une augmentation lente en jours courts (de 9 h ou de 9 h + R), durant l'ontogenèse de la plante ; au contraire, en jours longs de 16 h, une augmentation brutale se produit entre les stades 1, 2 et 3, suivie d'une diminution à

la floraison (stade 4), et d'une nouvelle augmentation au début de la maturation du premier fruit. En éclairement continu, l'évolution des teneurs en scopolamine est similaire à celle observée en 16 h, mais sans diminution très significative à la floraison. (Les dosages au stade 5, en éclairement continu n'ont pu être effectués, les feuilles terminales étant gênées dans leur développement par les plafonds des salles à cause de la grande taille de la plante). Il faut remarquer par ailleurs que c'est en éclairement continu que sont observées les plus fortes teneurs en scopolamine.

En 9 h + 7 h, l'augmentation de la scopolamine est analogue à celle observée en 16 h, ceci jusqu'au stade 3; elle se stabilise ensuite. Ainsi pour les quatre premiers stades les teneurs, exprimées en mg pour 100 g de feuilles fraîches, sont très proches de celles des plantes en jours longs, et identiques à celles-ci, si on les exprime en mg pour 100 g de feuilles sèches. Par contre, au stade 5, elles sont confondues avec celles des jours courts. Dans cette condition d'éclairement les plantes ont un aspect étiolé.

D'une façon générale, ce sont les feuilles des plantes cultivées en jours longs, sous un fort éclairement, qui présentent des valeurs élevées en scopolamine.

Les résultats des dosages de l'hyoscyamine montrent que cet alcaloïde existe en quantité très inférieure à celle de la scopolamine. Pour tous les conditionnements lumineux, il n'est présent qu'à l'état de traces, évaluées à 0, 5 mg pour 100 g de feuilles fraîches, aux stades 1 et 2. Au stade 3a, apparaissent des différences importantes: alors qu'il n'est toujours pas dosable en jours courts (9 h et 9 h + R), la teneur la plus élevée (6, 5 $\pm$ 1 mg/100 g P.F.) est observée en 9 h +7 h. Au stade 5 il n'existe aucune différence significative entre les cinq conditions lumineuses.

TABLEAU 3: Teneurs en scopolamine et en hyoscyamine des feuilles de Datura metel Sims aux différents stades pour les cinq conditions d'éclairement. Chaque moyenne est accompagnée de son intervalle de confiance pour le coefficient de sécurité de 95%.

Stades		ECLAIREMENT									
		9h		9h+R		9h+7h		16h		24h	
		Scop. (a)	Hyos. (b)	Scop.	Hyos.	Scop.	Hyos.	Scop.	Hyos.	Scop.	Hyos.
S.1	P.F. (c)	3, 5 ± 1	0, 5	5, 5 ± 1	0, 5	2 ± 0, 5	0, 5	2	0, 5	2, 5 ± 1	0, 5
	P.S. (d)	67, 5 ± 19	9, 5	105, 5 ± 19	9, 5	35, 5 ± 9	9	26	6, 5	29 ± 11, 5	6
S.2	P.F.	6 ± 1	0, 5	6 ± 1	0, 5	19, 5 ± 6	0, 5	23, 5 ± 1	0, 5	28 ± 0, 5	0, 5
	P.S.	62, 5 ± 10, 5	9, 5	62, 5 ± 10, 5	5	175 ± 54	4, 5	194 ± 8	4	202 ± 3, 5	3, 5
S.3a	P.F.	11 ± 3	0, 5	11 ± 3, 5	0, 5	43, 5 ± 8, 5	6, 5 ± 1	67, 5 ± 7	1, 5 ± 0, 5	74, 5 ± 8	3 ± 0, 5
	P.S.	106, 5 ± 29	5	86 ± 27, 5	4	334 ± 65, 5	47 ± 7, 5	395 ± 41	9 ± 3	445, 5 ± 48	18 ± 3
S.3b	P.F.							68, 5 ± 12	4, 5 ± 2	98, 5 ± 9, 5	6, 5 ± 1, 5
	P.S.							376, 5 ± 66	24, 5 ± 11, 5	601, 5 ± 58	39, 5 ± 9
S.4	P.F.	18 ± 1, 5	3, 5 ± 1	16 ± 1	3, 5 ± 0, 5	46 ± 9	4, 5 ± 1, 5	43, 5 ± 8, 5	4, 5 ± 2	96 ± 13, 5	10, 5 (e)
	P.S.	151 ± 12, 5	29, 5 ± 8, 5	118 ± 7, 5	26 ± 3, 5	258, 5 ± 50, 5	25, 5 ± 8, 5	209 ± 41	21, 5 ± 9, 5	497 ± 70	54, 5
S.5	P.F.	30 ± 5, 5	5 ± 0, 5	23, 5 ± 4, 5	4 ± 0, 5	40 ± 7, 5	6, 5 ± 1, 5	78 ± 14	5, 5 ± 1, 5		
	P.S.	235 ± 43	39 ± 4	178, 5 ± 34	30, 5 ± 4	242, 5 ± 45, 5	39, 5 ± 9	415 ± 74, 5	29 ± 7, 5		

(a) : Scop. = scopolamine; (b) : Hyos. = hyoscyamine; (c) : P.F. = en mg/100 de feuilles frafches ; (d) : P.S. = en mg/100 g de feuilles sèches; (e): moyenne de quatre dosages.

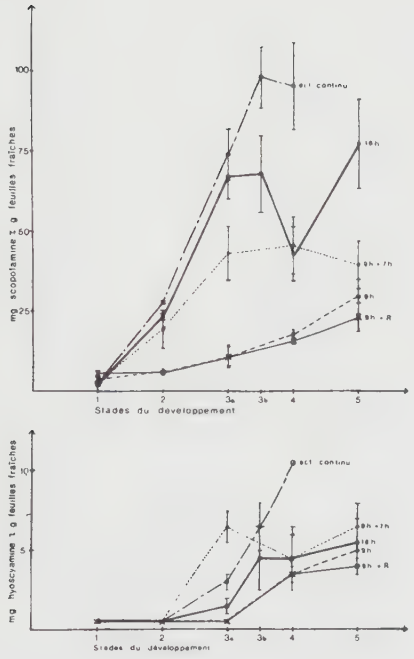


Fig.4. Variations ontogéniques de la scopolamine et de l'hyoscyamine selon l'éclairement chez Datura metel (Teneur exprimée en mg/100 g de feuilles fraîches).

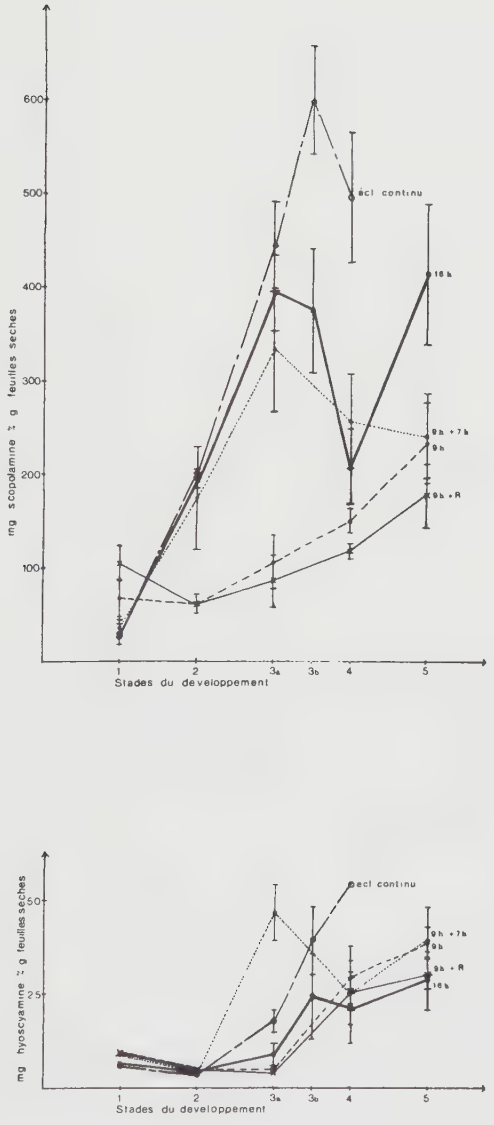


Fig. 5. Variations ontogéniques de la scopolamine et de l'hyoscyamine selon l'éclairement chez Datura metel (Teneur exprimée en mg/100 g de feuilles sèches).

L'étude du rapport de la scopolamine sur l'hyoscyamine, à partir du stade 3a (Tableau 4), met en évidence sa diminution, durant l'ontogenèse, pour les plantes en jours courts (9 h et 9 h + R) et en jours longs de 16 h, bien que la scopolamine reste toujours l'alcaloïde principal des feuilles.

Cependant, dans nos conditions expérimentales, ce rapport est un peu plus élevé chez les plantes en jours longs de 16 h, aux stades 3 et 5, que chez celles cultivées en jours courts de 9 h et de 9 h + R : un éclairement long de niveau élevé favorise l'accumulation de la scopolamine. Par contre en 9 h + 7 h, dès le stade 3, ce rapport est beaucoup plus faible que dans les autres conditions, et il ne varie que faiblement par la suite: cette valeur faible au stade 3 est principalement due à l'accumulation de l'hyoscyamine, la quantité de scopolamine présente étant plus proche de celle trouvée chez les plantes en 16 h que de celle des plantes en jours courts de 9 h.

TABLEAU 4: Valeurs des rapports scopolamine/hyoscyamine selon l'éclairement reçu par les plantes.

Stades	Eclairement			
	9 h	9 h + 7 h	16 h	24 h
Stade 3a	21, 9 ± 5, 9	6, 9 ± 1, 3	37, 6 ± 8, 2	25, 5 ± 3, 8
Stade 3b			16 ± 6, 9	15, 4 ± 4, 7
Stade 4	5, 6 ± 1, 5	11, 1 ± 2, 6	11, 8 ± 6	Non calculable
Stade 5	6, 1 ± 1, 2	6, 6 ± 2, 1	16 ± 6, 3	Non calculable

Chaque moyenne est accompagnée de son intervalle de confiance pour le coefficient de sécurité de 95%.

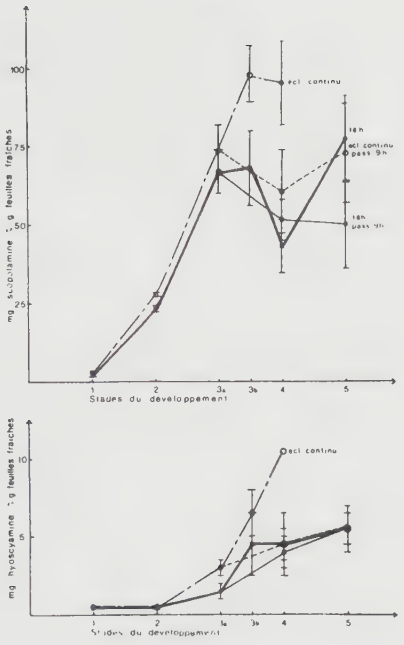


Fig. 6. Variations ontogéniques de la scopolamine et de l'hyoscyamine chez Datura metel. Comparaison entre les plantes toujours élevées dans leur condition d'origine (16 h ou éclairement continu) et celles ayant passé 10 jours en 9 h pour hâter la floraison.

La figure 6 illustre graphiquement les variations ontogéniques de la scopolamine et de l'hyoscyamine (en mg/100 g de feuilles fraîches) des plantes toujours cultivées en 16 h ou en éclairement continu, comparées à celles ayant passé 7 à 9 jours en 9 h, au stade 3 a, avant de retourner à leur condition d'origine : aucune différence significative n'est observable dans le cas des plantes cultivées en 16 h, alors que pour celles cultivées en éclairement continu la teneur en scopolamine est supérieure , au stade 4 , pour le lot étant toujours resté dans cette condition.

Il faut signaler qu'aucune de ces deux espèces ne montre, même à l'état de traces, du tropanol ou du scopanol libres dans les organes aériens des plantes ayant dépassé le stade 1 (COSSON, 1968). A ce stade, ces alcools ont pu être décelés dans des extraits de l'hypocotyle.

C- Teneur en alcaloïdes des racines.

Il n'a pas été possible de faire une étude quantitative systématique des teneurs en hyoscyamine et en scopolamine des racines, cela nécessitant une trop grande quantité de plantes, quantité bien supérieure à celle nécessaire aux dosages des alcaloïdes des feuilles.

Malgré cela , lors de chaque extraction , les racines, après avoir été débarrassées de la laine de verre et de la vermiculite sont traitées selon le mode opératoire précédemment décrit. Ceci permet de connaître l'ordre de grandeur de leurs teneurs en hyoscyamine et en scopolamine.

Celles de Datura tatula sont les suivantes pour les trois durées d'éclairement quotidien, exprimées pour 100 g de racines fraîches :

	Hyoscyamine (‰)	Scopolamine (‰)
16 h :	1 à 2 mg	0, 8 à 1, 3 mg
9h+7 h :	0, 7 à 1, 5 mg	0, 2 à 1 mg
9 h :	0, 8 à 1, 5 mg	0, 2 à 0, 7 mg

Il n'a pas été possible de mettre en évidence une éventuelle variation en fonction du stade de développement atteint par la plante. On peut seulement remarquer que l'hyoscyamine est l'alcaloïde dominant dans les racines.

Les résultats de l'analyse des racines de Datura metel sont exposés dans le tableau 5.

TABLEAU 5: Estimation de la teneur en hyoscyamine et en scopolamine exprimée en mg/100 g de racines fraîches de Datura metel.

Stade	Durée de l'éclairement	9h	9h+R	9h + 7h	16h (3)	24h (4)
2	Scop. (1)	+	++	3-2	4	5, 5
	Hy. (2)	4	+	6, 5-4, 5	15	15
3	Scop.	++	2, 5	2	9, 5-9	11-6, 5
	Hy.	3, 5	6	3, 5	13, 5-17, 5	14-13
4	Scop.	3, 5-3, 5	10	10, 5-7, 5	8, 5-8	7-9
	Hy.	6-10, 5	13	13	17-12	10-16
5	Scop.	6	++	7, 5-21, 5-8, 5	6	8
	Hy.	11, 5	11	18, 5-15-12	7, 5	15

(1) Scop.= scopolamine; (2) Hy.= hyoscyamine;(3) et (4) = Plantes ayant passé quelques jours en 9h d'éclairement quotidien entre le 3ème et le 4ème stade.

Pour cette espèce, l'hyoscyamine est aussi l'alcaloïde principal des racines;celles-ci montrent des teneurs en alcaloïdes beaucoup plus importantes que celles de Datura tatula.

Le tropanol et le scopanol libres ont été recherchés dans les extraits de racines.

Le premier est toujours présent dans les racines des deux espèces: celles de Datura tatula en contiennent environ 100 microgrammes pour 100 g de matière fraîche ; celles de Datura metel montrent des teneurs variant de 400 microgrammes à 2 mg.

Le scopanol n'a été décelé avec certitude que dans la radicule de la jeune plantule au stade 1 chez le Datura tatula.

CONCLUSION ET DISCUSSION.

Cette étude montre l'influence des conditions de l'éclairement sur les teneurs en hyoscyamine et en scopolamine des jeunes feuilles de Datura tatula et de Datura metel.

Les variations ontogéniques montrées par le Datura tatula en 16 h d'éclairement quotidien de haut niveau sont en conformité avec celles obtenues par EVANS et PARTRIDGE en 1953. Cette espèce appartient au groupe ne possédant la faculté d'époxydation de l'hyoscyamine que dans les stades de jeunesse de la plante.

Mais en 9 h ou en 9 h + 7 h, on ne trouve pas ces variations : les teneurs en hyoscyamine et en scopolamine sont similaires.

Un éclairement quotidien long et de niveau élevé est nécessaire à l'accumulation de la scopolamine au moment de la floraison.

Chez le Datura metel, on a vu que les conditions d'éclairement influent sur l'évolution des teneurs en alcaloïdes durant l'ontogenèse: dans nos conditions expérimentales, la teneur en alcaloïdes des feuilles de cette espèce dépend étroitement à la fois de son stade

physiologique et du conditionnement lumineux sous lequel elle s'est développée.

Dans ce cas les résultats obtenus montrent aussi qu'un éclairement long et de niveau élevé favorise l'accumulation des alcaloïdes : les teneurs les plus élevées sont observées en éclairement continu et en 16 h d'éclairement quotidien de niveau élevé. Les quantités de scopolamine et le rapport de la scopolamine sur l'hyoscyamine sont plus élevés en 16 h. Un éclairement long et de haut niveau favorise, au moins à certains stades du développement , l'accumulation de la scopolamine.

Le cas des plantes cultivées en 9 h + 7 h (condition ne présentant pas , ou peu , de différence énergétique par rapport à 9 h) montre qu'un autre phénomène a lieu. Dans ce cas, on obtient , pour le stade 3a, un rapport scopolamine - hyoscyamine beaucoup plus faible que dans toutes les autres conditions , ceci étant dû principalement à une accumulation de l'hyoscyamine , car la teneur en scopolamine est bien supérieure à celle observée en 9 h et proche de celle des plantes cultivées en 16 h. Ce résultat pourrait être lié à l'aspect étiolé des plantes et serait à rapprocher de ceux déjà trouvés concernant l'action de l'étiolement sur les plantes à alcaloïdes tropaniques (FLUCK , 1961 ; SAINT-FIRMIN et PARIS, 1968).

Chez le Datura metel la lumière intervient donc, et par la durée de l'éclairement , et par le niveau de celui-ci.

A l'inverse, seul un éclairement long et de niveau élevé provoque une augmentation de la teneur en scopolamine chez le Datura tatula.

Cette accumulation des deux principaux alcaloïdes, des Datura et principalement de la scopolamine , favorisée par un éclairement long et de niveau élevé , pourrait résulter d'une augmentation des processus anaboliques conduisant à ces substances ou à une diminution de leur dégradation.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE IN VITRO DE L'ACTIVITE DES ESTERASES HYDROLYSANT L'HYOSCYAMINE ET LA SCOPOLAMINE

Ayant constaté l'importance des variations de la teneur en hyoscyamine et en scopolamine dans les jeunes feuilles des Datura en fonction de l'éclairement et du stade de développement, nous avons recherché s'il existait parallèlement des modifications dans l'activité des estérases responsables de l'hydrolyse de ces alcaloïdes.

Une étude préliminaire (COSSON et PARIS, 1967) avait mis en évidence l'activité de ces estérases, in vitro, sur l'hyoscyamine et la scopolamine.

La réaction était catalysée par des précipités protéiques totaux obtenus par saturation , à l'aide de sulfate d'ammonium , du surnageant d'un broyat centrifugé à basse vitesse (12 000 x g).

Pour l'étude systématique de l'hydrolyse enzymatique de l'hyoscyamine et de la scopolamine chez les deux espèces de Datura , dans deux conditions d'éclairement , 9 h et 16 h , nous avons utilisé le surnageant d'un broyat au Potter, centrifugé à 120 000 x g .

Les résultats en sont consignés dans les tableaux 6 et 7.
Ils sont exprimés en centièmes de micromoles de tropanol ou de scopanol formés après 48 h d'incubation à 27°C de l'extrait enzymatique (correspondant à 400 mg de poids de matière végétale fraîche) avec 0,15 ml d'une solution d'hyoscyamine ou de scopolamine 0,1 M ; un autre tube contient dans ces mêmes proportions les deux substrats. Un tube témoin, sans substrat exogène, permet de déceler les traces éventuelles d'alcools préexistant à la réaction ou issues de l'hydrolyse des alcaloïdes contenus dans l'extrait enzymatique lui-même. Deux

TABLEAU 6: Activité hydrolytique, *in vitro*, de *Datura tatula*, exprimée en centièmes de micromoles de tropanol et de scopanol formés en 48 heures d'incubation de l'extrait enzymatique correspondant à:

1°) 400 mg de feuilles fraîches

	Plantes cultivées en 16 h				Plantes cultivées en 9 h			
Substrat	H.(1)	S.(2)	H.+S.(3)		H.(1)	S.(2)	H.+ S.(3)	
Alcool issu de l'hydrolyse	Tol(4)	Scol(5)	Tol(4)	Scol(5)	Tol(4)	Scol(5)	Tol(4)	Scol(5)
Stade 2	0	13(-)	14(-)	0	0	0	0	0
	14(-)	0	14(-)	0	0	0	14(-)	0
	0	13(-)	14(-)	0	0	0	14(-)	0
Stade 3	0	13(-)	14(-)	0	0	0	0	0
	14	13(-)	14	13(-)	14(-)	0	0	0
	34	30	14(-)	0	0	0	0	0
Stade 4	0	0	14(-)	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	14(-)	13(-)	0	0	0	0
Stade 5	14	0	14	0	14	13(-)	14	0
	24	13(-)	21	0	0	0	0	0
	14(-)	13(-)	14	13(-)	14(-)	0	14(-)	0

2°) 400 mg de racines fraîches

Stade 2	127	65	14	0	47	65	14(-)	0
	126	116	14(-)	0	47	130	98	65
	37	28	17	0	18	13	14(-)	13(-)
Stade 3	64	65	25	13(-)	14(-)	13(-)	14(-)	0
	47	43	53	26	14(-)	97	14(-)	97
	28	52	16	0	14(-)	73	47	13(-)
Stade 4	14(-)	13(-)	14(-)	0	14(-)	0	14(-)	0
	14	41	14	0	18	16	34	103
	14(-)	92	14(-)	0	14(-)	13(-)	14(-)	0
Stade 5	28	13(-)	28	13(-)	14	13(-)	0	0
	28	52	28	13(-)	14(-)	0	14(-)	0
	25	13(-)	14(-)	0	14(-)	0	14(-)	0

(1) H.=Substrat:hyoscyamine; (2) S.= Substrat:scopolamine; (3) H.+ S.=Substrats: hyoscyamine + scopolamine
(4) Tol.= Tropanol; (5) Scol.= Scopanol
13(-) = quantité inférieure à 13 micromoles; 14(-) = quantité inférieure à 14 micromoles.

autres tubes témoins contiennent chacun des substrats en présence de l'extrait enzymatique préalablement bouilli.

L'activité enzymatique a été suivie pour les stades 2, 3, 4 et 5, en utilisant dans chaque cas les jeunes feuilles.

Pour connaître celle des racines, la totalité en était broyée pour les stades 2, 3 et 4 de Datura tatula, pour les stades 2 et 3 de Datura metel. Dans les autres cas, seules les jeunes racines étaient utilisées. Chaque catégorie d'organe, pour chacun des stades, a donné lieu à trois essais.

A. Activité hydrolytique de Datura tatula (Tableau 6).

L'activité hydrolytique des jeunes feuilles provenant des plantes cultivées en 9 h est presque nulle ; elle est faible en 16 h. Si les deux alcaloïdes sont présents ensemble dans le milieu réactionnel, l'hyoscyamine est hydrolysée préférentiellement à la scopolamine. Il n'est pas observé de variation de l'activité estérasique des extraits enzymatiques de feuilles selon le stade de développement de la plante.

Alors que la quantité maximale de tropanol formé dans les feuilles est seulement de 34/100 de micromoles, on peut observer des valeurs de 50/100 à 1, 30 micromoles avec les extraits enzymatiques les plus actifs préparés à partir des racines.

Malgré l'hétérogénéité des résultats concernant les racines, il est possible de constater que l'hyoscyamine est hydrolysée préférentiellement à la scopolamine, lorsque les deux substrats sont présents dans le milieu réactionnel. Lorsqu'il n'y en a qu'un seul, on peut observer une tendance à la diminution de l'activité hydrolytique des extraits enzymatiques de racines, au stade 4, pour les plantes cultivées en 16 h d'éclairement quotidien.

L'activité des estérases des racines des plantes cultivées en 9 h diminue durant le développement :dès le stade 3, si le substrat fourni est l'hyoscyamine, à partir du stade 4 dans le cas de la

scopolamine.

D'une manière générale l'activité des extraits enzymatiques des racines est plus faible lorsque les deux alcaloïdes sont ajoutés ensemble au milieu réactionnel, que lors de la présence d'un seul d'entre eux: on observe des quantités de tropanol ou de scopanol beaucoup plus faibles dans le premier cas que dans le second. Ce phénomène est particulièrement net avec les extraits de racines provenant de plantes cultivées en 16 h.

Ce phénomène ne se produit pas avec les extraits enzymatiques préparés avec les feuilles.

B. Activité hydrolytique de Datura metel (Tableau 7).

L'activité hydrolytique des feuilles de Datura metel est faible et plus particulièrement vis-à-vis de la scopolamine : celle-ci ne donne naissance qu'à un maximum de 13/100 de micromoles de scopanol dans nos conditions expérimentales. Il ne semble pas y avoir de différence selon le conditionnement lumineux sous lequel les plantes se sont développées.

De la même façon que chez Datura tatula, l'hydrolyse de l'hyoscyamine est effectuée préférentiellement à celle de la scopolamine.

Les extraits enzymatiques de racines sont plus actifs et l'hydrolyse préférentielle de l'hyoscyamine se produit aussi, lorsque les deux alcaloïdes sont présents en même temps.

Il n'est pas observé de différence selon l'éclairement préalablement reçu par les plantes. De même il ne semble pas y avoir de variation en fonction du stade de développement atteint par la plante.

Le phénomène de diminution de l'activité due à la présence des deux alcaloïdes est moins net que dans le cas de Datura tatula.

D'une façon générale, le pouvoir hydrolytique est plus faible que celui observé chez Datura tatula.

TABLEAU 7: Activité hydrolytique, *in vitro*, de *Datura metel*, exprimée en centièmes de micromoles de tropanol et de scopanol formés en 48 heures d'incubation de l'extrait enzymatique correspondant à:

1°) 400 mg de feuilles fraîches.

	Plantes cultivées en 16 h				Plantes cultivées en 9 h			
Substrat	H.(1)	S.(2)	H. + S.(3)		H.(1)	S.(2)	H. + S.(3)	
Alcool issu de l'hydrolyse	Tol(4)	Scol(5)	Tol(4)	Scol(5)	Tol(4)	Scol(5)	Tol(4)	Scol(5)
Stade 2	28	13(-)	14(-)	13(-)	14(-)	0	14(-)	0
	14(-)	13	14	0	14	13(-)	23	13(-)
	0	0	0	0	21	0	23	0
Stade 3	0	0	14	0	14(-)	0	13(-)	0
	14(-)	0	14(-)	0	14(-)	13(-)	13	0
	14(-)	0	14(-)	0	14(-)	0	13(-)	0
Stade 4	0	0	0	0	0	0	0	0
	14(-)	0	14(-)	0	14(-)	0	14(-)	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
Stade 5	14(-)	13(-)	14	0	14(-)	13(-)	14(-)	0
					0	0	14(-)	0
	0	0	0	0	0	0	14(-)	0

2°) 400 mg de racines fraîches

Stade 2	28	13(-)	28	13(-)	51	86	18	0
	14	0	23	0	14	13(-)	14	13(-)
	24	13(-)	13(-)	0	14(-)	13(-)	14	0
Stade 3	47	13(-)	14(-)	0	18	103	14(-)	13
	14(-)	13(-)	21	0	14(-)	13(-)	14(-)	0
	14(-)	13(-)	14(-)	0	19	13(-)	23	0
Stade 4	14(-)	13(-)	28	26	21	13(-)	13(-)	0
	14(-)	0	14	0	16	13(-)	13(-)	0
	14(-)	0	0	0	35	13(-)	13(-)	0
Stade 5	23	17	14	0	14	13(-)	13	0
	14(-)	0	14(-)	0	14(-)	0	13(-)	0
					14(-)	0	13(-)	0

(1) H. = Substrat: hyoscyamine; (2) S. = Substrat : scopolamine
(3) H. + S. = substrats: hyoscyamine + scopolamine,
(4) Tol = Tropanol; (5) Scol = Scopanol.
13(-) = quantité inférieure à 13 micromoles; 14(-) = quantité inférieure à 14 micromoles.

DISCUSSION ET CONCLUSION DE L'ETUDE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE DE DATURA TATULA ET DE DATURA METEL.

Trois remarques principales se dégagent de cette étude.

1°) L'hydrolyse de l'hyoscyamine et de la scopolamine est très faible dans les feuilles, elle a surtout lieu dans les racines. Ce résultat nuance ceux des autres auteurs d'après lesquels il n'y aurait aucune hydrolyse de ces deux alcaloïdes dans les feuilles (EVANS, 1966).

2°) Lorsque ces deux alcaloïdes sont présents en quantités égales dans le milieu réactionnel, l'hydrolyse obtenue est plus faible qu'en présence d'un seul d'entre eux.

Dans ce cas, c'est l'hyoscyamine qui est hydrolysée préférentiellement:la régulation de la teneur en alcaloïdes, par voie catabolique, se ferait donc par l'intermédiaire de l'hyoscyamine.

L'hyoscyamine se formant dans la racine (ROMEIKE, 1961) et pouvant y être hydrolysée, la régulation de la teneur en alcaloïdes se ferait donc au niveau des racines : c'est la quantité d'hyoscyamine , résultant de l'équilibre entre sa formation et son hydrolyse, qui pourrait être transportée vers les feuilles. Elle peut s'y accumuler ou être transformée en scopolamine.

Ces hypothèses sont renforcées par l'impossibilité de mettre en évidence du tropanol libre dans les feuilles, alors qu'il en existe toujours de faibles quantités dans les racines.

Le fait que les racines contiennent beaucoup moins d'alcaloïdes que les feuilles confirme le rôle imparti à chaque organe : les feuilles étant le lieu d'accumulation, les racines élaborant les alcaloïdes et intervenant dans leur régulation.

Contrairement au tropanol, le scopanol issu de l'hydrolyse de la scopolamine ne s'accumule pas:on ne peut le mettre en évidence dans aucun organe des plantes ayant dépassé le stade cotylédonaire. Il faut donc admettre qu'il est à son tour rapidement métabolisé. Cet aspect est différent de celui remarqué par SAINT-FIRMIN et PARIS (1968) chez

Hyoscyamus muticus L. et Hyoscyamus aureus L. Ces auteurs ont en effet montré une accumulation des deux alcools sous certaines conditions d'éclairement.

L'hydrolyse préférentielle de l'hyoscyamine est un des procédés possibles de la régulation de la teneur en scopolamine. Il faut y ajouter les variations possibles de l'époxydation de l'hyoscyamine en scopolamine, indépendamment de la régulation éventuelle de la biogenèse initiale de l'hyoscyamine.

3°) Deux autres faits tendent à étayer l'hypothèse de l'intervention de l'hydrolyse comme facteur de régulation.

Datura tatula montre une nette diminution de l'hydrolyse au stade 4 en 16 h d'éclairement quotidien de niveau élevé, c'est à ce stade et dans cette condition qu'on observe une brusque augmentation de la teneur en alcaloïdes et principalement en scopolamine dans les organes aériens.

Datura metel dont les teneurs en alcaloïdes sont plus élevées que celles de Datura tatula présente parallèlement une activité hydrolytique plus faible.

Deux de ces résultats (l'hydrolyse préférentielle de l'hyoscyamine et la diminution de l'activité estérasique au stade 4 chez Datura tatula) sont différents de ceux de JINDRA et coll. (1958, 1959). Ces auteurs ont montré chez Datura stramonium que la scopolamine était l'alcaloïde le plus hydrolysé et que l'activité était très faible pendant les treize premières semaines du développement.

Ces variations de l'activité des estérases ne suffisent cependant pas à expliquer l'ensemble des différences observées dans les teneurs alcaloïdiques des feuilles en fonction de l'éclairement reçu par les plantes. Nous avons alors essayé d'obtenir l'époxydation de l'hyoscyamine en scopolamine in vitro à l'aide d'extraits enzymatiques du même type que les précédents, en faisant varier le pH du milieu réactionnel et en utilisant différents co-facteurs tels que l'A.T.P. Nous n'avons pas pu mettre en évidence cette époxydation, mais c'est au cours de ces essais que nous avons mis en évidence une autre réaction enzymatique qui se manifeste dès qu'une solution d'A.T.P. est ajoutée à l'extrait enzymatique. La présence de substrats exogènes tels que hyoscyamine, scopolamine ou tropanol n'empêche pas la réaction d'avoir lieu.

TROISIEME PARTIE

ETUDE IN VITRO DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS ENZYMATIQUES DE FEUILLES DE DATURA TATULA ET DE DATURA METEL EN PRESENCE D'A.T.P. (acide adénosine triphosphorique).

1- Etude de la vitesse de réaction.

L'étude de cette réaction a été faite sans dosage du produit formé. C'est principalement sa vitesse qui a été suivie par des prélèvements des milieux réactionnels immédiatement chromatographiés. Ces prélèvements étaient faits après 15, 30 et 50 minutes de contact entre l'extrait enzymatique et l'A.T.P. La réaction était arrêtée au bout d'une heure par adjonction d'alcool, l'ensemble évaporé, et repris par 0, 3 ml d'alcool à 50°, 15 microlitres en étant chromatographiés.

Nous rappellerons que le produit formé lors de cette réaction apparaît en rouge foncé sur le fond jaune des chromatogrammes révélés par le réactif de Dragendorff.

Les deux espèces de Datura ont été essayées pour connaître leur aptitude vis-à-vis de cette réaction. Deux conditions d'éclairement ont été choisies : 9 h et 16 h. Les résultats sont exposés dans le tableau 8.

Les plus grandes vitesses de réaction sont observées pour les feuilles du Datura metel cultivé en 16 h d'éclairement quotidien : à tous les stades du développement le produit obtenu est mis en évidence après 10 minutes de contact. La vitesse semble maximale au stade 3. Lorsque la même espèce est cultivée en 9 h, c'est seulement à partir du stade 4 que le produit apparaît après 10 minutes de réaction.

Les extraits enzymatiques de feuilles de Datura tatula montrent une élévation de la vitesse de réaction aux deux derniers stades des plantes cultivées én 16 h. On ne peut déceler la substance formée qu'après 1 heure de contact dans le cas des feuilles issues des plantes en 9 h, exception faite du quatrième stade.

TABLEAU 8: Activité des extraits enzymatiques de jeunes feuilles de Datura, en présence d'A.T.P., à quatre stades du développement des plantes cultivées en 9 h et en 16 h d'éclairement quotidien.

a) Datura tatula.

Durée de la réaction (en minutes)	16 h				9 h			
	15	30	50	60	15	30	50	60
Stade 2	0	0	0	0	0	0	0	+
Stade 3	0	0	+	+	0	0	0	+
Stade 4	0	+	+	++	+	+	+	+
Stade 5	0	+	+	++	0	0	0	+

b) Datura metel.

Stade 2	+	++	+++	+++	0	0	0	++
Stade 3	+	+++	++++	++++	0	+	++	++
Stade 4	+	++	++	+++	+	+	+	++
Stade 5	+	++	++	++	+	+	+	++

Cette réaction n'a jamais pu être obtenue à partir d'extraits enzymatiques de racines, malgré un temps de contact de 2 h 30.

Des extraits enzymatiques ont été préparés à partir de feuilles ayant terminé leur croissance et prélevées sur Datura metel au stade 3 et sur Datura tatula au stade 4 , en 16 h d'éclairement quotidien. Dans tous ces cas l'activité n'était décelable qu'après 1 h de contact.

Des extraits enzymatiques très actifs, effectués à partir de jeunes feuilles, ont été dialysés dans des "ultra-gaines SELECTRON " (Schleicher et Schull) (1). La dialyse était accélérée par l'effet de dépression produit par une trompe à eau. Ces membranes dialysantes ne retiennent que les molécules d'un poids moléculaire supérieur à 10 000. La dialyse durait 3 à 4 heures durant lesquelles la gaine était maintenue constamment humide par adjonction de tampon phosphate de pH = 6, 5. La solution de protéines ainsi obtenue était utilisée comme extrait enzymatique et mise en contact avec la solution d'A.T.P. en respectant les proportions habituelles : 0,10 ml de solution d'A.T.P. (à 100 mg/ml) pour un volume de solution protéique représentant un poids initial de 400 mg de feuilles fraîches.

Dans ces conditions , on observe seulement une diminution de la vitesse de réaction : le produit élaboré n'est décelable qu'après 30 minutes de contact.

Cette réaction enzymatique ne se produit pas avec un extrait enzymatique préalablement porté pendant trois minutes à la chaleur d'un bain-marie bouillant ; elle n'a pas lieu en l'absence d'A.T.P. Seul celui-ci est exogène dans cette réaction.

---

(1) Fournies en France par CERA-LABO.

2- Analyse de la substance élaborée par les extraits enzymatiques de feuilles en présence d'A.T.P.

Le produit formé lors de la réaction est très soluble dans l'eau distillée et dans l'alcool dilué, légèrement soluble dans l'alcool à 95°, insoluble dans le chloroforme et la plupart des solvants organiques courants.

Pour en permettre l'analyse, de plus grandes quantités ont été préparées en utilisant un extrait enzymatique issu de 30 g de jeunes feuilles de Datura metel prélevées sur des plantes au stade 3, en 16 h d'éclairement quotidien. Cet extrait est mis en contact pendant deux heures avec 7, 5 ml de la solution d'A.T.P.

Après arrêt de la réaction par l'alcool, la suspension est évaporée à l'évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par 20 ml d'eau distillée, la solution alcanalisée par l'ammoniaque. Les alcaloïdes présents sont éliminés par quatre agitations avec 25 ml de chloroforme à chaque fois. Après décantation du chloroforme, la solution aqueuse est évaporée à sec, le résidu repris par 4 ml d'eau distillée et cette solution déposée sur des couches de silice (1) d'un mm d'épaisseur, le dépôt étant effectué à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille. Le chromatogramme est développé dans le solvant acétone-chloroforme-ammoniaque à 25% (160-10-10 ml). Après séchage dans un courant d'air froid, la zone correspondant à la substance est repérée sous une lampe à ultra-violet à 254 nm, une pulvérisation du réactif de Dragendorff sur une bande très étroite au centre du chromatogramme, en précise les limites. Huit à dix plaques préparatives sont nécessaires pour les 4 ml de solution.

Après grattage de la zone de silice correspondant à la substance ainsi délimitée, l'élution de la poudre est faite par l'alcool à 50°,

---

(1) : Kieselgel H. (Merck).

suivie d'une évaporation sous vide dans une fiole préalablement tarée de façon à connaître approximativement le poids de substance obtenue à l'état sec et purifié. La pureté en est vérifiée par une nouvelle chromatographie sur couche mince de silice , en n'utilisant qu'une infime fraction du produit à analyser.

Ainsi purifiée la substance présente une forte absorption à 260 nm, en solution hydroalcoolique.

La réaction de caractérisation des phénols , au chlorure ferrique , est négative.

Après chromatographie sur couche mince de cellulose , dans le solvant n-butanol , acide acétique , eau (4, 1, 5 v/v), la révélation à la ninhydrine montre une tache de couleur brune de faible Rf.

Nous avons hydrolysé des quantités précises du produit par l'acide chlorhydrique , dilué au demi , pendant 4, 9 et 25 heures d'ébullition , dans un matras surmonté d'un tube de verre de 1 m servant de réfrigérant (40 ml d'acide chlorhydrique dilué au demi pour 19 mg de produit à hydrolyser).

L'analyse des acides aminés libérés par l'hydrolyse a été menée selon la méthode décrite par HUBAC, GUERRIER et FERRAN (1969).

Après élimination de l'acide chlorhydrique par entraînement à l'eau à l'évaporateur rotatif, l'hydrolysat est purifié par passage sur colonne de résine Dowex 50. Après lavage à l'eau, les acides aminés sont élués par l'ammoniaque 2N. Cet éluat est évaporé à l'évaporateur rotatif, repris par de l'eau qui est à son tour évaporée. Ceci est répété plusieurs fois de suite jusqu'à élimination de l'ammoniaque.

L'ensemble de ces manipulations conduit à l'obtention d'un résidu sec qui est dissous dans un mélange d'acide acétique à 1% , de glycérol à 50% et d'une solution témoin de nor-leucine. Cette solution est alors analysée par l'Autoanalyseur Technicon.

Les calculs permettant de connaître les quantités des différents acides aminés sont effectués selon la méthode décrite par J.M. et C.HUBAC (1970).

Le tableau 9 donne les valeurs obtenues pour les trois durées d'hydrolyse. Ces résultats sont exprimés en micromoles par g de substance analysée.

L'utilisation de différentes durées d'hydrolyse fait varier dans de fortes proportions les quantités des différents acides aminés libérés: la glycine passant de 103 micromoles, après 4 h , à 966 micromoles au bout de 25 h . Pour cette même durée , l'arginine n'est pas dosable, alors qu'il en est trouvé 110 micromoles après 4 h. Outre ces deux acides aminés , d'autres sont en quantités notables après une hydrolyse de 4 h: l'acide aspartique , la thréonine et la sérine,(1) l'acide glutamique , l'alanine et l'histidine.

Si ces résultats , exprimés en micromoles dans le tableau 9 , sont présentés en mg , on obtient alors les valeurs suivantes pour 25 h, 9 h 30 et 4 h d'hydrolyse : 81, 32 et 56 mg d'acides aminés pour 1 g de substance hydrolysée.

Les acides aminés ne constituent donc qu'une faible proportion de cette substance , entre 3 et 8%.

Une fraction des hydrolysats préparés pour l'autoanalyseur Technicon a été alors déposée sur une couche mince de silice. Ce

---

(1) Ces deux acides aminés sont incomplètement séparés par l'autoanalyseur Technicon. Ils sont calculés ensemble.

TABLEAU 9: Acides aminés libérés par l'hydrolyse chlorhydrique, à l'ébullition, de la substance obtenue à partir des extraits enzymatiques de Datura metel mis en présence d'A.T.P. (Les quantités sont exprimées en micromoles/ g de substance analysée).

Acides aminés	Durée de l'hydrolyse		
	25 h	9 h 30	4 h
Acide aspartique	Traces	Traces	15
Thréonine+Sérine	17	Traces	35
Acide glutamique	19	29	40
Glycine	966	353	103
Alanine	0	0	41
Valine	Traces	Traces	Traces
Isoleucine	Traces	Traces	Traces
Leucine	Traces	Traces	Traces
Phénylalanine	Traces	Traces	Traces
Histidine	23	11	85
Arginine	Traces	Traces	110

chromatogramme est développé dans le solvant habituel (acétone, chloroforme, ammoniaque à 25%); révélé par le réactif de Dragendorff, il montre qu'une partie de la substance demeure inchangée après l'hydrolyse chlorhydrique.

Par ailleurs, une hydrolyse de la substance par l'acide sulfurique N, à l'ébullition dans un matras surmonté d'un tube de verre de 1 m, pendant 1 heure, permet de mettre en évidence du ribose dans l'hydrolysat. Celui-ci est neutralisé par de la soude diluée, concentré et analysé. Cette analyse est faite par chromatographie sur couche mince de cellulose développée dans le solvant butanol-acide acétique-eau (4, 1, 5 v/v) , la révélation étant faite par une solution hydroalcoolique de p-anisidine acidifiée par l'acide phosphorique. Dans ce cas, le ribose est décelé par l'apparition d'une tache marron sur le fond jaune du chromatogramme.

Une vérification par l'autoanalyseur Technicon , adapté au dosage des sucres (CATRAVAS, 1966) , a permis de confirmer la présence du ribose dans la molécule de la substance.

La substance a été enfin hydrolysée par l'acide perchlorique , pendant 1 heure, à 100°C (0, 4 ml d'acide pour 20 mg de substance) . L'hydrolysat a été chromatographié sur couche mince de cellulose dans le solvant isopropanol , acide chlorhydrique, eau (65 ml , 16 ml , 100 ml) selon la technique de BENDICH (1957). Le chromatogramme, observé sous un rayonnement ultra-violet de 260 nm, révèle une tache dont le Rf est de 0, 47 , identique à celui de l'adénine utilisée comme témoin.

3- Teneur en acides aminés libres et totaux de certains des extraits enzymatiques utilisés pour la réaction.

Cette étude a été effectuée sur les extraits enzymatiques de jeunes feuilles de Datura metel au stade 2 en 9 h et au stade 3 en 16 h.

Le premier de ces deux extraits a été choisi comme exemple de ceux présentant une faible activité enzymatique en présence d'A.T.P. Le deuxième au contraire correspond au maximum de cette activité.

Le dosage des acides aminés, présents à l'état libre dans ces extraits, a été effectué , après passage sur Dowex 50 , par l'autoanalyseur Technicon selon la méthode précédemment décrite. Il en a été de même pour le dosage des acides aminés totaux après 24 heures d'hydrolyse à l'ébullition par l'acide chlorhydrique dilué au demi.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 10. Les quantités d'acides aminés sont exprimées en micromoles par g de feuilles fraîches.

Les jeunes feuilles de Datura metel, prélevées sur des plantes parvenues au stade 3 sous un éclairement quotidien de 16 h , contiennent une plus grande quantité d'acides aminés libres que celles provenant de plantes au stade 2 soumises à 9 h d'éclairement : les premières contiennent 17, 84 micromoles par g , les secondes n'en ont que 6, 19.

TABLEAU 10: Teneur en acides aminés libres et en acides aminés totaux, après 24 h d'hydrolyse chlorhydrique à l'ébullition , des extraits enzymatiques de jeunes feuilles de Datura metel. (Résultats exprimés en micromoles/g de feuilles fraîches; moyennes résultant de l'analyse de deux extraits différents).

Acides aminés	16 h St.3		9 h St.2	
	Libres	Après hydrolyse	Libres	Après hydrolyse
Acide aspartique	0, 63	3, 44	0, 65	2, 61
Thréonine+Sérine	3, 33	9, 30	1, 49	6, 40
Acide glutamique	3, 01	4, 23	1, 83	8, 73
Proline	5, 62	9, 27	Traces	3, 83
Glycine	0, 23	3, 71	0, 36	4, 84
Alanine	0, 90	4, 72	0, 86	7, 23
Valine	0, 29	2, 76	0, 17	5, 26
Isoleucine	0, 19	1, 90	Traces	3, 01
Leucine	0, 24	2, 94	Traces	6, 02
Tyrosine	0, 12	0, 57	Traces	Traces
Phénylalanine	0, 20	1, 46	0, 13	2, 63
Ac. γ-aminobutyrique (1)	1, 80	1, 05	0, 55	2, 32
Ornithine	Traces	Traces	Traces	Traces
Lysine	0, 48	1, 92	Traces	2, 88
Histidine	0, 22	1, 04	Traces	1, 15
Arginine	0, 58	1, 44	0, 15	2, 96
Total	17, 84	49, 75	6, 19	59, 87

(1) : Il est vraisemblable qu'il se produit une destruction partielle de l'acide γ-aminobutyrique.

TABLEAU 11: Teneur en acides aminés libres et en acides aminés totaux, après 24 h d'hydrolyse chlorhydrique à l'ébullition (1), des extraits enzymatiques de racines de Datura metel. (Résultats exprimés en micromoles/g de racines fraîches : moyenne résultant de l'analyse de deux extraits différents).

Acides aminés	16 h St.3		9 h St.2	
	Libres	Après hydrolyse	Libres	Après hydrolyse
Ac.aspartique	0, 29	0, 88	0, 36	0, 29
Thréonine+Sérine (1)	1, 70	1, 02	0, 77	0, 32
Ac.glutamique (1)	0, 95	1, 71	0, 90	0, 50
Proline	Traces	1, 50	-	0, 43
Glycine	0, 76	0, 87	0, 26	0, 35
Alanine	0, 50	0, 87	0, 27	0, 42
Valine	0, 22	0, 50	Traces	0, 32
Isoleucine	0, 16	0, 32	Traces	0, 20
Leucine	0, 17	0, 57	Traces	0, 40
Tyrosine	Traces	0, 11	-	Traces
Phénylalanine	0, 17	0, 30	0, 10	Traces
Ac. γ-aminobutyrique (1)	0, 33	0, 23	0, 31	0, 19
Ornithine	Traces	Traces	Traces	-
Lysine	0, 20	0, 34	Traces	0, 19
Histidine	0, 20	0, 51	Traces	0, 38
Arginine (1)	0, 16	0, 33	0, 20	0, 14
Total	5, 81	10, 06	2, 97	4, 13

(1) : La très faible teneur des racines en acides aminés et les conditions brutales de l'hydrolyse, produisant des destructions partielles, ne permettent de donner qu'une approximation des teneurs.

Dans les feuilles des plantes au stade 3 en 16 h , les acides aminés libres représentent environ 35% des acides aminés totaux dosés après hydrolyse. Cette proportion est abaissée à 10, 5% dans le cas des plantes au stade 2 en 9 h. Ces dernières, par contre, donnent une valeur plus élevée pour les acides aminés dosés après hydrolyse.

Qualitativement il faut remarquer la présence, en grande quantité , de proline libre dans les feuilles du stade 3 en 16 h ; seules des traces peuvent en être décelées au stade 2 en 9 h.

Des dosages correspondants aux précédents , effectués sur les extraits enzymatiques de racines ont fourni les résultats rassemblés dans le tableau 11. Ils montrent les faibles teneurs en acides aminés des racines. En 9 h au stade 2 , les quantités étant particulièrement faibles, le dosage aboutit à l'impossibilité de mettre en évidence pour certains acides aminés, une différence entre leur valeur avant et après hydrolyse.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Un premier fait remarquable est le parallèlisme étroit qui existe entre cette réaction , catalysée par l'A.T.P., et l'accumulation des alcaloïdes dans les feuilles : la réaction est d'autant plus rapide que les feuilles sont en période d'intense accumulation de l'hyoscyamine et de la scopolamine. Le maximum se situe au stade 3 chez Datura metel cultivé en 16 h , les minima sont observés chez Datura tatula au stade 2 en 16 h et aux stades 2 et 3 en 9 h.

Les différentes caractéristiques de la réaction sont les suivantes :

- l'A.T.P. est nécessaire à sa manifestation ,
- elle n'a pas lieu avec des extraits enzymatiques de feuilles ayant terminé leur croissance ,

- elle a lieu à un pH acide,

- le produit qui en est l'aboutissement, dans nos conditions expérimentales, libère par hydrolyse des acides aminés qui ne représentent pas la totalité du poids de substance initialement soumis à l'hydrolyse. La présence de ribose dans la molécule est prouvée par deux méthodes et la recherche des bases puriques a permis de déceler l'adénine. Cette substance présente une forte absorption à 260 nm.

C'est en fonction de ces caractéristiques précises que l'hypothèse suivante peut être formulée au sujet de cette réaction : nous serions en présence d'une "réaction d'activation " des acides aminés par "l'enzyme pH = 5 " et l'A.T.P.

Cette réaction a été décrite à différentes reprises chez les végétaux comme étant le point de départ de la synthèse des protéines (WEBSTER, 1957 ; MARCUS, 1959).

Une revue des diverses séquences réactionnelles impliquées dans cette biosynthèse chez les plantes, a été faite par MANS (1967) et plus récemment par BOULTER (1970).

Dans notre cas, la substance produite par la réaction pourrait être le complexe formé par les acides aminés fixés soit sur l'A.M.P., soit sur l'acide ribonucléique. Nos conditions expérimentales ne nous permettent pas de connaître la séquence précise devant laquelle nous nous trouvons.

Nous avons vu qu'une hydrolyse de 25 h libère de grandes quantités de glycine , alors qu'une hydrolyse de 4 h n'en produit que neuf fois moins environ. Ces faits renforcent l'hypothèse avancée au sujet de la substance produite par la réaction : fixation d'acides aminés sur des composés renfermant dans leur molécule des bases puriques.

En effet LINDSAY , PAITH et COHEN (1962) ont mis en évidence la production de glycine par l'hydrolyse acide des bases puriques et de leurs dérivés: la glycine est d'autant plus abondante que l'hydrolyse dure plus longtemps.

Notre expérimentation a montré une grande différence entre la vitesse de réaction des extraits enzymatiques de feuilles de Datura metel au stade 3 en 16 h et celle du stade 2 en 9h.

Ceci peut s'expliquer par le fait que les acides aminés qui se fixent sur le complexe pendant la réaction sont plus abondants, à l'état libre, dans les feuilles du stade 3 en 16 h que dans celles du stade 2 en 9 h.

Ces acides aminés, fixés sur le complexe , sont au nombre de sept : acide aspartique , thréonine + sérine, acide glutamique , alanine, histidine et arginine (après 4 h d'hydrolyse) .Pour 1 g de feuilles, ces sept acides aminés , à l'état libre, représentent 8, 67 micromoles en 16 h au stade 3 , seulement 4, 98 micromoles en 9 h au stade 2.

Pour 1 g de racines, ces valeurs sont de 3, 80 en 16 h au stade 3 et de 2, 50 au stade 2 en 9 h.

Aucun élément expérimental direct ne nous permet d'émettre une hypothèse concernant l'activité de l'enzyme elle-même. Il est cependant vraisemblable qu'elle n'est pas présente dans les racines ou qu'elle s'y trouve sous une forme inactive ; il n'a jamais été observé de réaction à partir d'extraits enzymatiques de racines, les acides aminés nécessaires étant cependant présents , quoiqu'en quantités plus faibles que dans les feuilles.

Cette réaction d'activation des acides aminés , dont l'intensité est parallèle à l'accumulation des alcaloïdes dans les feuilles , peut-elle être liée directement au métabolisme des alcaloïdes?

Certains auteurs émettent l'hypothèse que cette réaction ne serait pas impliquée uniquement dans la synthèse des protéines, mais aussi dans d'autres processus biogénétiques (SYNGE, 1968).

Si cette réaction concourt à la biosynthèse des alcaloïdes, un seul

des acides aminés fixés sur le complexe formé peut être considéré comme précurseur : l'arginine, dont la transformation ultérieure en ornithine a été mentionnée comme pouvant intervenir dans la régulation du métabolisme des alcaloïdes tropaniques (JINDRA et coll., 1959).

Il est remarquable que l'ornithine n'est présente qu'à l'état de traces dans les extraits que nous avons analysés. Par contre un autre précurseur, la proline, est présent à l'état libre en grande quantité dans les feuilles au stade 3 en 16 h : 5, 62 micromoles par g de feuilles fraîches.

Le tableau 12 compare, pour les feuilles au stade 3 en 16 h et au stade 2 en 9 h , les quantités d'acides aminés pouvant être considérés soit comme des précurseurs directs des alcaloïdes tropaniques, soit comme précurseurs indirects grâce aux transformations possibles de l'un dans l'autre.

Ces acides aminés sont présents en grande quantité , à l'état libre, en 16 h au stade 3 (9, 21 micromoles par g de feuilles fraîches), alors qu'il n'y en a que 1, 98 micromoles en 9 h au stade 2. Par contre, les valeurs trouvées après hydrolyse sont très semblables pour les deux sortes d'extraits. Ainsi, en 9 h au stade 2, les acides aminés considérés comme nécessaires à la biosynthèse des alcaloïdes sont en grande partie sous forme liée, alors qu'en 16 h au stade 3 ils sont à l'état libre (acide glutamique, arginine, proline).

Dans les deux cas, il n'existe que des traces d'ornithine, acide aminé considéré comme étant le précurseur principal.

Récemment la concomitance des variations des teneurs en acides aminés et en alcaloïdes a été également observée chez les Vinca par PARIS et GIRRE (1969).

TABLEAU 12: Teneurs en acides aminés (précurseurs directs ou indirects des alcaloïdes tropaniques) des feuilles de Datura metel (en micromoles/g de feuille fraîche).

Acides aminés	Libres		Après hydrolyse	
	16 h St.3	9 h St.2	16 h St.3	9 h St.2
Acide glutamique	3, 01	1, 83	4, 23	8, 73
Ornithine	Traces	Traces	Traces	Traces
Arginine	0, 58	0, 15	1, 44	2, 96
Proline	5, 62	Traces	9, 27	3, 83
Total	9, 21	1, 98	14, 94	15, 52

V. CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail envisage l'influence de l'éclairement sur le métabolisme des alcaloïdes de deux Solanacées appartenant au genre Datura.

L'utilisation des conditions de culture offertes par le Phytotron du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette nous ont permis de montrer qu'à température et humidité constantes (27°C et 70% d'humidité relative), LA DUREE QUOTIDIENNE DE L'ECLAIREMENT ET SON NIVEAU ont une grande influence sur l'accumulation des alcaloïdes- esters (hyoscyamine et scopolamine) dans les feuilles de Datura tatula L. et de Datura metel Sims.

D'une façon générale, un éclairement long et de haut niveau (14 000 à 18 000 lux pendant 16 heures) favorise l'accumulation des alcaloïdes et particulièrement de la scopolamine.

Partant de la mise en évidence de ce phénomène, nous avons essayé d'en trouver l'explication, tant au niveau du catabolisme des alcaloïdes qu'à celui des processus anaboliques conduisant à leur formation.

A l'aide d'extraits enzymatiques nous avons pu étudier LES ESTERASES responsables de l'hydrolyse de l'hyoscyamine et de la scopolamine in vitro : l'activité en était suivie grâce à l'apparition des aminoalcools (tropanol ou scopanol) issus de l'hydrolyse.

Nous avons démontré que ces estérases sont surtout actives au niveau des racines et qu'elles hydrolysent préférentiellement l'hyoscyamine. Cette hydrolyse semble être plus faible dans les racines de Datura tatula en 16 h d'éclairement quotidien au stade 4 et correspondre ainsi à l'accumulation des alcaloïdes dans les feuilles à ce stade de développement et dans cette condition. De même l'hydrolyse est moins importante chez Datura metel, espèce dont les teneurs alcaloïdiques sont plus élevées que celles de Datura tatula.

UNE REACTION D'ACTIVATION DES ACIDES AMINES a été mise en évidence in vitro à l'aide d'extraits enzymatiques de jeunes feuilles,

prélevées sur les plantes des deux espèces cultivées en 9 h et 16 h d'éclairement quotidien. L'intensité de cette réaction in vitro étant parallèle à l'accumulation des alcaloïdes dans les feuilles, nous avons émis l'hypothèse que cette activation des acides aminés serait une des étapes de la voie conduisant des acides aminés libres à la constitution du noyau tropane. En effet, deux précurseurs indirects du noyau tropane, l'acide glutamique et surtout l'arginine, sont présents dans le complexe issu de la réaction; l'analyse de celui-ci a montré qu'il renferme d'autres acides aminés en quantités notables (acide aspartique, thréonine, sérine, glycine, alanine et histidine); le ribose et l'adénine font également partie de la molécule de ce complexe.

Nous avons dosé LES ACIDES AMINES LIBRES ET LES ACIDES AMINES TOTAUX , après hydrolyse chlorhydrique, d'extraits enzymatiques de jeunes feuilles de Datura metel prélevées dans deux conditions: en 16 h d'éclairement quotidien au stade 3, en 9 h au stade 2. Le premier cas correspond à une forte accumulation des alcaloïdes et à l'intensité maximale de la réaction d'activation, le deuxième à une accumulation faible et à une réaction d'activation d'intensité minimale. Il est remarquable de constater que l'ensemble des acides aminés considérés comme des précurseurs directs et indirects, des alcaloïdes tropaniques sont en plus grande quantité, à l'état libre, en 16 h au stade 3 qu'en 9 h au stade 2. Dans ce dernier cas, ils sont principalement sous forme liée. Ces acides aminés sont l'acide glutamique, l'arginine et la proline; l'ornithine n'est présente qu'à l'état de traces non dosables dans les deux cas, alors qu'elle est habituellement considérée comme le précurseur direct le plus important. La comparaison de l'ensemble des résultats obtenus avec les feuilles de Datura metel prélevées au stade 2 en 9 h et au stade 3 en 16 h peut être résumée ainsi :

En 9 h au stade 2		En 16 h au stade 3	
Faible teneur alcaloïdique (mg hyoscyamine+scopolamine /100 g P.F.)	6, 5	Forte teneur alcaloïdique (mg hyoscyamine+scopolamine /100 g P.F.)	69
Faible teneur en acides aminés libres, précurseurs des alcaloïdes (en uM/g P.F.)	1, 98	Forte teneur en acides aminés libres, précurseurs des alcaloïdes (en µM/g P.F.)	9, 21
Quantités importantes d'acides aminés, précurseurs des alcaloïdes, se trouvant sous forme liée (en µM/ g P.F.)	13, 54	Quantités faibles d'acides aminés précurseurs des alcaloïdes, se trouvant sous forme liée (en µM/ g P.F.)	5, 73
Temps nécessaire à l'apparition de la réaction d'activation (en minutes)	60	Temps nécessaire à l'apparition de la réaction d'activation (en minutes)	15

On peut donc supposer que le métabolisme de l'acide glutamique, de l'arginine et de la proline est principalement orienté vers la biogenèse des alcaloïdes dans les feuilles des plantes cultivées en 16 h d'éclairement quotidien. L'utilisation de l'arginine et de l'acide glutamique dans la biogenèse des alcaloïdes se ferait par une " réaction d'activation " , celle de la proline aurait lieu d'une autre façon , car elle n'est pas présente dans le complexe issu de la réaction d'activation.

Contrairement , à ceci , dans les feuilles des plantes cultivées en "journées courtes " de 9 h , l'acide glutamique , l'arginine et la proline serviraient surtout à la biogenèse d'autres composés, vraisemblablement de nature protéique : la plus grande partie de ces trois acides aminés n'est en effet dosable, dans ce cas, qu'après hydrolyse chlorhydrique des extraits enzymatiques.

Cette hypothèse, concernant deux orientations différentes du métabolisme de certains acides aminés, s'oppose à celle qui tend à faire des alcaloïdes des substances de déchets , issues du catabolisme des protéines.

Ainsi, en étudiant l'influence de l'éclairement sur l'accumulation de l'hyoscyamine et de la scopolamine dans les feuilles des Datura , nous avons pu apporter quelques faits nouveaux concernant la biogenèse de ces alcaloïdes.

BIBLIOGRAPHIE

ANDRZEJCZUK J., KACZKOWSKI J., 1962- Biosynteza alkaloidov tropanowych. I. Esteryfikacja tropiny i kwasu tropomego. Acta Soc. Bot. Polonial , 31, 461-469.

BENDICH A., 1957. Methods for characterization of nucleic acids by base composition. In Methods in Enzymology , III, 715-723.

BOULTER D., 1970. Protein synthesis in plants. Annual Rev. Pl. Physiol., 21, 91-114.

CATRAVAS G.N., 1966. New developments in automatic sugar chromatography . Automation in analytical chemistry (Technicon symposia , 1966, vol. 1, 397-400) Edit. Mediad. Inc., N.Y., 1967.

CHOUARD P. et TRAN THANH VAN M., 1964. Vernalisation sans réfrigération par les facteurs trophiques de la vigueur , grande luminosit et niveau élevé de la nutrition minérale chez le Geum urbanum L. C.R. Ac. Sc., Paris, 259 , 4783-4786.

COSSON L. , CHOUARD P. et PARIS R., 1966. Influence de l'éclairement sur les variations ontogéniques des alcaloïdes de Datura tatula . LLoydia , 29, 19-25.

COSSON L. , et PARIS R., 1967. Mise en évidence de la dégradation in vitro de l'hyoscyamine et de la scopolamine par des préparations enzymatiques obtenues à partir du Datura tatula L. à différents stades de son développement. C.R. Ac. Sc. Paris, 265, 202-204.

COSSON L., 1968. Quelques aspects du métabolisme des alcaloïdes de Datura tatula L. Plantes Médic. et Phytoth., II, 269-271.

COSSON L., 1969. Influence de l'éclairement sur les variations ontogéniques des teneurs en scopolamine et en hyoscyamine des feuilles de Datura metel. Phytoch., 8, 2227-2233.

COSSON L., 1970. Importance de l'environnement et des étapes du développement sur la teneur en alcaloïdes des Datura cultivés en conditions artificielles. Comm. au XVIIIe Congrès Int. Hortic. Tel-Aviv.

CUCU V. und PAUN E., 1968. Über die Veränderung des Alkaloidgehaltes im Kraut von Datura innoxia Mill. Pl. Med., 16, 338-342.

EVANS W.C. and PARTRIDGE M.W., 1953. Alkaloid biogenesis. Part II. Changes in the ontogenic production of alkaloids in Atropa and Datura. J. Pharm. and Pharmacol., 5, 772-777.

EVANS W.C. and PARTRIDGE M.W., 1954. Alkaloid biogenesis. III. The production of biosynthetic radioactive hyoscine and meteloidine. J. Pharm. and Pharmacol., 6, 702-706.

EVANS W.C. and STEVENSON N.A., 1962. Studies on Datura leichhardtii Muell. ex Beuth. Part II. Alkaloid constituents. J. Pharm. Pharmacol. Suppl., 14, 107-110.

EVANS W.C., 1966. The physiology and biochemistry of tropane alkaloids Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, 3, 507-519.

FLUCK H., 1955. The influence of climate on the active principles in medicinal plants. J. Pharm. and Pharmacol., 7, 361-383.

FLUCK H, 1961. Influence des facteurs externes sur la teneur en substances secondaires et sur leur formation (en particulier alcaloïdes, hétérosides et huiles essentielles). Bull. Soc. Franç. Phys. végét., 7, 5-14.

GERTIG H, CZYZAK D., 1962. Zmiennosc zespolu alkaloidov w Datura sanguinea R. et P. Wokresie sezonu wegetacyjnego. Act. Polon. Pharmac., 19, 167-173.

GIBSON M.R. and ABBOTT E.R., 1963. The effect of proline on growth and alkaloid synthesis in Datura stramonium var. tatula. Lloydia, 26, 125-131.

GIBSON M.R. and DANQUIST G.A., 1965. Incorporation of hydroxyproline ^{14}C into the principal alkaloids of Datura innoxia Mill. J. Pharm. Sc., 54, 1526-1528.

GOODEVE A.M. and RAMSTAD E., 1961. Tryptophan , precursor of tropic acid in Datura stramonium. Experientia , 17, 124-125.

GUILLON A., 1950. Les alcaloïdes du Datura stramonium au cours de son développement. C.R.Ac.Sc. Paris, 230, 1604-1606.

HUBAC C, GUERRIER D., et FERRAN J., 1969. Résistance à la sécheresse du Carex pachystylis (J.Gay) plante du désert du Néguev. Oecol. Plant., 4, 325-346.

HUBAC J.M. et HUBAC.C., 1970. Programme de calcul Fortran pour l'intégration des courbes de dosages d'acides aminés à l'aide de l'Autoanalyzer Technicon. Symp. Technicon, Conférence n°48.

JINDRA A., ZADRAZIL S., and CERNA S., 1958. Biosynthesis of alkaloids. II. Enzymatic hydrolysis of tropane alkaloids. Chem. Listy, 52, 2388-2393.

JINDRA A., ZADRAZIL S., JIRACEK V. and SYROVY I., 1959. Biosynthesis of alkaloids. III. Influence of manganese ions on arginase activity, alkaloid content and N metabolism in Jimson weed. Pl. med., 7, 174-184.

JINDRA A., ZADRAZIL S. und CERNA S., 1959. Biosynthese von Alkaloiden. II. Enzymatische hydrolyse der tropanalkaloide. Coll. Czech. Chem. Comm., 24, 2761-2767.

JINDRA A., LEBLOVA S., SIPAL Z. und CIHAK A., 1960. Beitrag zur Kenntnis der Biosynthese von Tropanalkaloiden. IV. Mitteilung. Pl. Med. 8, 43-48.

JINDRA A. and STABA E.J., 1968. Datura tissue cultures : arginase, transaminase and esterase activities. Phytoch. 7 , 79-82.

KACZKOWSKI J., 1959. Praca doktorska wykonana w Kadedrze Biochemii SGGW , Warszawa.

KACZKOWSKI J., SCHUTTE H.R. und MOTHES K., 1960. Die Rolle des Acetats in der Biosynthese der Tropanalkaloide. Naturw., 47, 304-305.

KACZKOWSKI J. , SCHUTTE H.R. und MOTHES K., 1961. Die Rolle des Acetats in der Biosynthese der Tropanalkaloide. Biochem. Biophys. Acta , 46 , 588-594.

KACZKOWSKI J. and MARION L., 1963. The incorporation of putrescine into hyoscyamine. Canad. J. Chem., 41, 2651-2653.

KACZKOWSKI J., 1965. Badania nad biosynteza alkaloidow tropanovych. Polskie Towarzystwo Biochemiczne-Warszawa Monografie Biochemiczne, 8 , 36 p.

KOUASSI B. et PEAUD-LENOEL C., 1970. Sur la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques par les cultures de tissu de Datura metel. C.R. Séances Soc. Biol., 164, 46-52.

LEETE E. and LOUDEN M.L., 1961. Biogenesis of tropic acid : origin of the hydroxymethyl group. Chem. and Ind., 1405-1406.

LEETE E. and LOUDEN M.L., 1963. Incorporation of putrescine into the tropine moiety of Hyoscyamine. Chem. and Ind., 1725-1726.

LEETE E., 1964. Biosynthesis of Hyoscyamine : proof that ornithine 2-^{14}C yields tropine labelled at C-1. Tetrah. Letters , 24 , 1619-1622.

LIEBISCH H.W. , SCHUTTE H.R. und MOTHES K. , 1963. Zur Biosynthese der Tropanalkaloide .IV. Putrescine als mögliche Vorstufe des Pyrrolidin Rings der Tropanalkaloide. Liebigs Ann. Chem., 668, 139-144.

LIEBISCH H.W. , MAIER W. und SCHUTTE H.R. , 1966. Zur Biosynthese der Tropanalkaloide VI. N-methyl-putrescin als eine mögliche Vorstuffe des Pyrrolidin Rings in Hyoscyamin und Scopolamin. Tetrah. Letters , 34 , 4079-4082.

LINDSAY R.H. , PAITH W.K. and COHEN P.P., 1962. Hydrolytic degradation of purine derivatives to glycine. Bioch. Biophys. Acta , 58, 585-587.

MANS R.J., 1967. Protein synthesis in higher plants. Ann. rev. Plant. Phys., 18, 127-146.

MARCUS A., 1959. Amino-acid dependent exchange between pyrophosphate and adenosine triphosphate in spinach preparations. J. Biol. Chem., 234, 1238-1240.

MOTHES K., 1960. Alkaloids in the plant , in : The Alkaloids, vol. VI, ch. 1, 1-23. Edit. Manske R.H.F., Acad. Press, N.Y.

MOTHES K., 1963. The biosynthesis of alkaloids. Angewandte Chemie, Int. édit. 2, 341-357.

PARIS R.R. et COSSON L., 1965. Sur la biogenèse des alcaloïdes des Datura: étude des variations ontogéniques à l'aide d'une méthode chromatographique chez le Datura metel Sims. C.R. Ac. Sc. Paris, 260, 3148-3151.

PARIS R.R. et GIRRE R.L., 1969. Sur les variations concomitantes des acides aminés et des alcaloïdes chez les Pervenches indigènes (Vinca major L. V. media Hoffg. et Link et V. minor L.) . C.R. Acad. Sc., Paris, 268, 62-64.

ROBINSON T., 1968. The biochemistry of alkaloids: Chap. 5. Tropane alkaloids. Edit.: Springer-Verlag.

ROMEIKE A., 1956. Uber die Mitwirkung des Sprosses bei der Ausbildung des Alkaloid spektrums. Flora , 143 , 67-86.

ROMEIKE A., 1959. Zur Biogenese des Scopolamins. Naturw., 46, 492-493.

ROMEIKE A, 1960. Uber ein Zwischenprodukt bei der Epoxydierung des Hyoscyamins in der lebenden Pflanze. Naturw., 47 , 64-65.

ROMEIKE A, 1961. Sur la biogenèse de la scopolamine. Bull. Soc. Fr. Phys. Vég., 7, 33-35.

ROMEIKE A., 1963. Sekundäre Umwandlung von Hyoscyamin im Spross von Datura-Arten. Abh. deut. Akad. Wiss. Berlin , 4, 179-185.

ROUSSELET R., 1963. De l'essai des médicaments à alcaloïdes par chromatographie et électrophorèse sur papier. Thèse Ph. Univ. Paris.

SAINT FIRMIN A. et PARIS R.R., 1967. A new method for determining alkaloids of the atropine group by thin-layer chromatography. J. Chr., 31, 252-254.

SAINT FIRMIN A. et PARIS R.R., 1968. Mise en évidence du tropanol et du scopanol à l'état libre au cours de l'ontogenèse des alcaloïdes chez Hyoscyamus muticus L. et Hyoscyamus aureus L. C.R. Ac. Sc. Paris , 267 , 1448 1449.

SOKOLOV V.S., 1959. The influence of certain environmental factors on the formation and accumulation of alkaloids in plants. Symp. Soc. Exp. Biol., 13, 230-257.

SYNGE R.L.M., 1968. Occurence in plants of amino-acids residues chemically bound otherwise than in proteins. Ann. Rev. Pl. Phys., 19, 113-136.

SULLIVAN G., GIBSON M.R., 1964. Incorporation of proline - ^{14}C into the principal alkaloids of Datura stramonium var. tatula and Datura innoxia. J. Pharm. Sc., 53, 1058-1063.

VERZAR- PETRI G., 1965- Formation of the alkaloid spectrum of therapeutically important Datura species during ontogenesis. Acta Biol. Hung., 16, 141 -154.

VERZAR-PETRI G., 1966 a. Formation of the amino-acid spectrum during the ontogenesis in some Datura species. Ann. Univ. Sc. Budapest , 8 , 357-373.

VERZAR-PETRI G., 1966 b . Gestaltung des Alkaloidspektrum in einigen Datura-Arten während der Ontogenese. Abh. deut. Akad Wiss. Berlin , 3, 557-562.

VERZAR-PETRI G., 1966 c. Ontogenetische Veränderung des Alkaloidgehaltes einiger Datura-Arten. Die. Pharmazie , 21, 48-54.

VERZAR-PETRI G., 1967. Contributions to the pharmacobotanical knowledge of Datura metel L. var. muriatica (Bernh.) under hungarica conditions. Acta Agron. Acad. Sc. Hung., 16, 175-188.

WEBSTER G.C., 1957. Amino-acid incorporation by intact and disrupted ribonucleoprotein particles. J. Biol. Chem., 229, 535-546.

TABLE DES MATIERES

Pages

I.INTRODUCTION 1

II HISTORIQUE 2

III. MATERIEL ET METHODES 9

A. Matériel et conditions de culture..... 9

B. Techniques analytiques 10

1) Obtention des extraits alcooliques 10

2) Techniques concernant les activités enzymatiques 12

a) Hydrolyse in vitro . Préparation des extraits enzymatiques. Etude de la réaction 12

b) Réaction enzymatique catalysée par l'A.T.P..... 15

IV. RESULTATS EXPERIMENTAUX 17

PREMIERE PARTIE

TENEUR EN ALCALOIDES DE DATURA TATULA L. ET DE DATURA METEL Sims CULTIVES SOUS DIVERSES CONDITIONS D'ECLAIREMENT 17

A. Teneur en hyoscyamine et en scopolamine des organes aériens de Datura tatula L..... 17

B. Teneur en hyoscyamine et en scopolamine des jeunes feuilles de Datura metel Sims..... 21

C. Teneur en alcaloïdes des racines..... 28

CONCLUSION ET DISCUSSION 30

DEUXIEME PARTIE

ETUDE IN VITRO DE L'ACTIVITE DES ESTERASES HYDROLYSANT L'HYOSCYAMINE ET LA SCOPOLAMINE..... 32

A. Activité hydrolytique de Datura tatula 34

B. Activité hydrolytique de Datura metel 35

DISCUSSION ET CONCLUSION 37

Pages

TROISIEME PARTIE

ETUDE IN VITRO DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS ENZYMATIQUES DE FEUILLES DE DATURA TATULA ET DE DATURA METEL EN PRESENCE D'A.T.P. 39

1. Etude de la vitesse de la réaction 39

2. Analyse de la substance élaborée par les extraits enzymatiques de feuilles en présence d'A.T.P. 42

3. Teneur en acides aminés libres et totaux de certains des extraits enzymatiques utilisés pour la réaction 46

CONCLUSION ET DISCUSSION 49

V. CONCLUSIONS GENERALES 54

VI. BIBLIOGRAPHIE 58

TABLE DES MATIERES 65

Académie de Paris

UNIVERSITE de PARIS VI
11, Quai Saint Bernard - Paris 5

SERVICE DE LA SCOLARITE
Bureau des Enseignements du 3e Cycle

tél. 336.25.25 et 325.12.21

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : DOCTORAT ES SCIENCES

THESE DE : SCIENCES NATURELLES

NOM : COSSON

Prénoms : LOUIS

né le 16/7 19 37 à ST FARGEAU Dépt SEINE & MARNE

1ère THESE : Influence sur l'éclairement sur la teneur en alcaloïdes tropaniques des Datura : analyse des processus pouvant en expliquer les effets

2e THESE (Propositions faites par l'Université) :

Vu et Approuvé

PARIS, le 2 MARS 1972

Le Président

de l'Université de PARIS VI

Service de Reprographie
C . N . R . S .
Gif